U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

ELISABETE BARROS DE CARVALHO

Estudos da interacção entre proteínas e taninos:

Influência da presença de polissacarídeos

Departamento de Química

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2007

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000119504

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

ELISABETE BARROS DE CARVALHO

Estudos da interacção entre proteínas e taninos:

Influência da presença de polissacarídeos

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Cota
Coloc.
N.º 9602
Depart. Química

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Para obtenção do grau de Doutor em Química

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2007

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e as Instituições que, de alguma forma, contribuíram, directa ou indirectamente, para o bom desenrolar deste trabalho, ajudando-me a ultrapassar os diversos obstáculos que se me foram deparando ao longo de todo este percurso:

Em primeiro lugar, desejo expressar o meu mais profundo e sincero reconhecimento ao Professor Doutor Víctor A. P. de Freitas, supervisor desta dissertação, pelo enorme e incansável acompanhamento científico, pelos imprescindíveis ensinamentos, apoios e incentivos constantemente demonstrados, e também por estar sempre presente e disponível não só a nível académico mas também com a sua amizade, ao longo de todo este trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Corrêa, desejo expressar a minha admiração e o meu sincero agradecimento pelos apoios concedidos, pela simpatia e amizade sempre manifestadas.

À Professora Doutora Maria Augusta Oliveira, o meu agradecimento pelos ensinamentos e apoios concedidos, e ainda pela simpatia e amizade sempre demonstradas. Gostaria de alargar este agradecimento a todos os membros da secção da Química Orgânica, pela disponibilidade e amizade manifestadas.

Ao Doutor Nuno Mateus, o meu sincero reconhecimento pelas valiosas discussões científicas, pelos inúmeros apoios concedidos, indispensáveis para o desenrolar do trabalho, e pela paciência, boa disposição e espírito prático que sempre demonstrou. Queria também agradecer muito sinceramente a amizade e a compreensão em todos os momentos.

Ao Doutor Erick Dufourc e Doutora Isabel Pianet, o meu reconhecimento pelas valiosas discussões científicas, pelos apoios concedidos na realização da síntese proteica, indispensáveis para o desenrolar do trabalho, e pela hospitalidade aquando da minha estadia em Bordéus.

Ao Doutor Benoit Plet, desejo expressar o meu agradecimento pelo apoio e pelo tempo que dispensou a apoiar-me na síntese proteica, pelas inúmeras discussões cientificas, e o meu mais sincero reconhecimento pela amizade e hospitalidade aquando da minha estadia em Bordéus. Gostaria de alargar este reconhecimento a Kattel Bathany pelos apoios concedidos na realização das análises de espectrometria de massa e ao Doutor Claude Manigand pelos

inúmeros apoios técnicos. Gostaria também de agradecer aos restantes membros do laboratório do IECB pela sua amizade e apoio.

Ao Professor Doutor Miguel Castanho, desejo expressar o meu mais sincero agradecimento pelo apoio na implementação do uso do fluorímetro, e pela disponibilidade demonstrada.

Ao Engº José Maria Machado, desejo expressar o meu sincero reconhecimento e admiração pelos inúmeros e indispensáveis ensinamentos enológicos, pelas frutíferas discussões científicas, e ainda pela grande amizade demonstrada desde o início deste trabalho.

À Dra Adelina Macedo, não poderia deixa de expressar o meu profundo agradecimento pela assistência técnica que me disponibilizou ao longo de todo este trabalho, e, ainda, pela sua enorme simpatia e amizade sempre demonstrada.

Aos Doutores António e Maria Antónia Sillero, desejo agradecer os valiosos ensinamentos e todos os conselhos que me deram.

À Doutora Nélia Fortunato, não poderia deixar de agradecer, para além da sua amizade e apoio, o estar disponível em todos os momentos e o imenso apoio dado nas análises de GC-MS.

Aos meus colegas de laboratório, Doutor João Pissarra, Dra Patrícia Porto, Dra Sandra Lourenço, Dra Joana Oliveira, Dra Ana Faria, Dr Carlos Sousa, Dra Natacha Maganete, Dr Luís Cruz, Dra Ana Luísa Fernandes, Doutor Jingren He pelos inúmeros momentos inesquecíveis, pela amizade e excelente ambiente de trabalho proporcionado. Um especial agradecimento à Dra Maria João Povoas e Dra Catarina Luís pelo valioso contributo que deram para esta tese. Gostaria de alargar este agradecimento a todos os seminaristas e estagiários das Licenciaturas em Química e Bioquímica que passaram pelo laboratório, pela amizade e pelo excelente ambiente igualmente proporcionado.

De entre as várias entidades que contribuíram para a realização experimental deste trabalho, às quais é extensivo o meu reconhecimento, saliento:

- A Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo financiamento concedido através de uma bolsa de Doutoramento (SFRH / BD / 9325 / 2002).
- A Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e nomeadamente o Departamento de Química, por me ter aceite como aluno de Doutoramento, e pelos diversos apoios logísticos concedidos.
- A Linha 2 do Centro de Investigação em Química (CIQ), pelos apoios logísticos e financeiros concedidos ao longo deste trabalho.
- O Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), pelos diversos apoios concedidos.
- A Empresa Adriano Ramos Pinto, Vinhos S. A., pelos vinhos fornecidos.
- A Empresa Vinha Comprida, pelos vinhos fornecidos.
- A ABAC, Advanced Bioproducts, por ter oferecido as manoproteínas de levedura.

A terminar, desejo expressar o meu mais profundo e sincero reconhecimento aos inúmeros, mas não esquecidos, amigos e à minha família, pelos diversos momentos e vivências inesquecíveis com reflexo directo na minha vida pessoal e profissional, e também por todas os apoios informáticos, gráficos, bibliográficos e existenciais. Um agradecimento especial ao Gil, por sempre me ter apoiado. A todos muito obrigado.

Resumo

A formação de agregados proteína-tanino foi medida por nefelometria; a agregação aumenta com concentração de BSA até um valor máximo de turvação, mas, na presença de excesso de proteína observa-se uma diminuição de agregação.

O aumento da força iónica pela adição de NaCl diminui a agregação entre BSA e taninos. A influência de diversos carboidratos na interacção entre taninos e procianidinas foi determinada. Os carboidratos usados foram o dextrano, a glucose, a arabinogalactana, β-ciclodextrina, pectina, goma arábica, acido poligalacturónico e xantano.

No geral o aumento da concentração de carboidrato levou a uma diminuição da formação de complexos proteína-tanino. A Pectina, o xantano, o ácido poligalacturónico e a goma arábica mostraram ser mais eficazes na diminuição de agregados proteína-tanino que a glucose, a β-ciclodextrina, o dextrano e a arabinogalactana.

Desenvolveu-se uma nova técnica que permite a medição de agregados proteína-tanino de um modo contínuo. Esta técnica mostrou ser prática e versátil, permitindo avaliar a influência de diversos factores (concentração de proteína e tanino, presença de etanol e polissacarídeos, etc) de um modo rápido e fiável, mesmo em matrizes complexas como o vinho.

Usando esta técnica a interacção de taninos de diversas fontes (grainha de uva, película de uva e vinho) com a BSA foi estudada. As amostras de tanino foram misturadas numa câmara de mistura com concentrações crescentes de BSA e os agregados proteína-tanino resultantes passaram por uma célula de fluxo e foram monitorizados.

Com base nesta técnica a Actividade Tanante Especifica de um vinho pode ser directamente calculada sem diluições ou tratamentos prévios.

Esta técnica foi também empregue para estudar a capacidade dos polissacarídeos xantano, dextrano e goma arábica impedirem as interacções entre taninos e BSA. O polissacarídeo xantano mostrou a maior capacidade de inibir a formação de agregados entre taninos e BSA do que os restantes polissacarídeos. A capacidade do xantano inibir a interacção proteína-tanino mostrou ser superior para os polissacarídeos menores e menos complexos.

A α-amilase, uma das principais proteínas salivares, e IB8c, uma representante das proteínas salivares ricas em prolina, foram obtidas por isolamento e síntese química em fase sólida, respectivamente. As interacções entre estas proteínas e taninos condensados foram estudadas a diferentes concentrações de proteína e tanino medindo a sua agregação.

Isolaram-se polissacarídeos do vinho e avaliou-se o seu efeito na agregação proteína-tanino. Os resultados mostram que as fracções mais acídicas de arabinogalactana-proteínas e manoproteínas têm a capacidade de inibir a formação de agregados entre taninos e as ambas

as proteínas salivares. A ramnogalacturonana II mostrou ter capacidade de inibir a interacção α-amilase-tanino, mas não a IB8c-tanino nas condições deste estudo. A interacção entre α-amilase e tanino é afectada por alterações na força iónica de um modo diferente das interacções IB8c-tanino. O efeito dos polissacarídeos nestas interacções também é afectado pela força iónica.

Abstract

The formation of polyphenol/BSA aggregates was measured by nephelometry; the aggregation increased with BSA concentration up to a maximum turbidity value but, in the presence of excess protein, a decrease of the complexes was observed. Increase in ionic strength by NaCl addition decreased the amount of BSA-tannin aggregates. The influence of the following carbohydrate concentration on the interactions of BSA with procyanidin compounds was assayed using nephelometry: dextran, glucose, arabinogalactan, β-cyclodextrin, pectin, gum arabic, polygalacturonic acid and xanthan. Overall, carbohydrate concentration induced a decrease in aggregation of protein-tannin complexes, with neutral and ionic polysaccharides displaying different behaviours in this process. Pectin, xanthan, polygalacturonic acid and gum arabic were much more effective decreasing protein/tannin aggregates than glucose, dextran, β-cyclodextrin or arabinogalactan.

A new flow nephelometric technique was developed that allows the measurement of protein-tannin aggregates in a continuous manner. This technique has shown to be very versatile and practical, allowing to measure the influence of several factors (protein concentration, tannin concentration, ethanol, polysaccharides, etc) in a very rapid and reliable way, even in complex samples such as wine. Using this technique the interaction of tannins from different sources (grape skin, grape seed and wine) with BSA was studied. The tannin samples were mixed in a reaction chamber with increasing BSA concentration and the resulting tannin–BSA aggregates passed through a flow cell where the turbidity was monitored. Based on this technique, the tannin specific activity (TSA) of wine can be directly determined from different wine flows without previous dilutions or any other treatment.

This technique was also employed to study the ability of the polysaccharides xanthan, dextran and gum arabic to disrupt the interactions between condensed tannin fractions from grape seed and BSA. Xanthan showed to have a higher ability to inhibit the aggregate formation of tannins and BSA than the other polysaccharides. Xanthan's ability to inhibit protein-tannin complex formation was higher on condensed tannin fractions of lower size and complexity.

α–amylase, a major human salivary protein, and IB8c, a representative of the proline-rich proteins, were obtained by isolation from saliva and by solid-phase synthesis, respectively. The interactions between these proteins and condensed tannins isolated from grape seeds were studied at different protein and tannin concentrations by measuring their aggregation. Polysaccharides were isolated from wine, and their effect on protein tannin aggregation was assessed. The results presented in this study showed that the most acidic fractions of

arabinogalactan-proteins and mannoproteins have the ability to inhibit the formation of aggregates between the grape seed tannins and the two different salivary proteins.

Rhamnogalacturonan II has the same ability toward α-amylase but not IB8c under the conditions of the present study. Polysaccharides show effects at concentrations at which they are present in wine, which could mean an influence in wine astringency. The interaction between condensed tannins and α-amylase is differently affected by ionic strength when compared with IB8c. The effect of polysaccharides is also affected by ionic strength.

Resumé

La formation des agrégats de polyphenol/BSA a été mesurée par néphélométrie; l'agrégation a augmenté avec la concentration de BSA jusqu'à une valeur maximum de turbidité mais, en présence de la protéine excessive, une diminution des complexes a été observée. L'augmentation de la concentration ionique par l'addition de NaCl a diminué la quantité d'agrégats de BSA-tannin. On a analysé l'influence de la concentration suivante en hydrate de carbone sur les interactions de BSA avec des composés de procyanidin en utilisant la néphélométrie : dextrane, glucose, arabinogalactane, β-cyclodextrine, pectine, gomme arabique, acide polygalacturonique et xanthane. De façon générale, la concentration en hydrate de carbone induit une diminution de l'agrégation des complexes de protéine-tannin, avec des polysaccharides neutres et ioniques montrant différents comportements dans ce processus. La pectine, le xanthane, l'acide polygalacturonique et la gomme arabique étaient des agrégats décroissants beaucoup plus efficaces de protéine/tannin que le glucose, dextrane, β-cyclodextrine ou arabinogalactane.

On a développé une technique néphélométrique en flux continue qui permet la mesure des agrégats de protéine-tannin d'une façon continue. Cette technique a montré pour être très souple et pratique, laissant mesurer l'influence de plusieurs facteurs (concentration en protéine, concentration en tannin, éthanol, polysaccharides, etc.) d'une manière très rapide et fiable, même dans les échantillons complexes tels que le vin. En utilisant cette technique l'interaction des tannins de différentes sources (peau de raisin, graine de raisin et vin) avec BSA a été étudiée. Les échantillons de tannin ont été mélangés dans une chambre de réaction avec l'augmentation de la concentration de BSA et les agrégats résultants de tannin-BSA passés par une cellule de débitmètre où la turbidité a été surveillée. Basé sur cette technique, l'activité spécifique de tannin (TSA) du vin peut être directement déterminée à partir de différents écoulements de vin sans dilutions précédentes ou n'importe quel autre traitement. Cette technique a été également utilisée pour étudier la capacité des polysaccharides xanthane, dextrane et gomme arabique de perturber les interactions entre les fractions de tannin condensées de de la graine de raisin et le BSA. Le xanthane a montré pour avoir une capacité plus élevée d'empêcher la formation globale des tannins et du BSA que les autres polysaccharides. La capacité du xanthane d'empêcher la formation complexe de protéine-tannin était plus haute sur les fractions condensées de tannin de la taille et de la complexité inférieures. L'α-amylase, une protéine salivaire humaine importante, et IB8c, un représentant des protéines proline-riches, ont été obtenus par l'isolement dans la salive et par la synthèse en phase solide, respectivement. Les interactions entre ces protéines et tannins condensés

d'isolement dans des graines de raisin ont été étudiées à différentes concentrations en protéine et en tannin en mesurant leur agrégation. Des polysaccharides ont été isolés dans le vin, et leur effet sur l'agrégation de tannin de protéine a été évalué. Les résultats ont présenté dans cette étude ont prouvé que les fractions les plus acides des arabinogalactane-protéines et des mannoproteins ont la capacité d'empêcher la formation des agrégats entre les tannins de graine de raisin et les deux protéines salivaires différentes. Rhamnogalacturonan II a la même capacité vers le α-amylase mais pas IB8c dans les conditions de la présente étude. Les polysaccharides montrent des effets aux concentrations auxquelles ils sont présents en vin, qui pourrait signifier une influence dans l'astringence de vin. L'interaction entre les tannins et l'α-amylase est différemment affectée par concentration ionique en comparaison avec IB8c. L'effet des polysaccharides est également affecté par concentration ionique.

Índice

1 INTRODUÇÃO 23

1.1 POLIFENÓIS 24

1.1.1 Importância dos polifenóis na alimentação 25

1.1.1.1 Características sensoriais 25

1.1.1.2 Consumo diário de polifenóis 25

1.1.1.3 Impacto dos polifenóis na saúde humana 26

1.1.1.4 Impacto dos polifenóis na digestão 27

1.2 TANINOS 28

1.2.1 Taninos hidrolisáveis 28

1.2.2 Taninos condensados 30

1.3 INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS 34

1.3.1 Tipos de interacção 34

1.3.2 Modelos de interacção propostos para a agregação de complexos proteína-tanino 39

1.3.3 Factores que influenciam a interacção entre as proteínas e os polifenóis 42

1.3.3.1 Estrutura dos polifenóis 42

1.3.3.2 Estrutura das proteínas 47

1.3.3.3 pH do meio 49

1.3.3.4 Força iónica 49

1.3.3.5 Outros factores 51

1.4 A ADSTRINGÊNCIA 53

1.4.1 Mecanismo da adstringência 54

1.4.2 Proteínas salivares 57

1.4.2.1 PRPs básicas 58

1.4.3 Interacções entre taninos e proteínas salivares 61

1.4.3.1 PRPs enquanto defesa contra efeitos dos taninos 64

1.4.4 Factores que influenciam a adstringência 64

1.4.4.1 Características do provador 65

1.4.4.2 Características do alimento degustado 66

1.4.5 Influência dos polissacarídeos na adstringência 66

1.4.5.1 Perda de adstringência dos frutos durante o amadurecimento 66

1.4.5.2 Inibição da interacção entre proteínas e taninos por polissacarídeos 69

1.4.5.3 Mecanismos da inibição da interacção entre proteínas e taninos por polissacarídeos 71

1.4.5.4 Polissacarídeos do vinho 74

1.5 MÉTODOS DE ESTUDO DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E POLIFENÓIS 77

1.5.1 Proteínas utilizadas no estudo das interacções com polifenóis 78

1.5.2 Compostos polifenólicos utilizados em estudos de interacção com proteínas 79

2 OBJECTIVOS 80

3 MATERIAL E MÉTODOS 83

3.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS 84

3.1.1 Extracção de procianidinas de grainha de uva 84

3.1.1.1 Purificação das procianidinas oligoméricas por cromatografia líquida 84
3.1.1.2 Fraccionamento do extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas por cromatografia líquida.. 84
3.1.1.3 Caracterização das procianidinas por espectrometria LSI-MS 85
3.1.2 Preparação de um extracto de película *86*
3.2 ISOLAMENTO E SÍNTESE DE PROTEÍNAS 87
3.2.1 Síntese de IB8c *87*
3.2.1.1 Síntese química em fase sólida 87
3.2.1.2 Clivagem da resina 87
3.2.1.3 Purificação do péptido por RP-HPLC 88
3.2.1.4 Verificação da composição por espectrometria de massa 88
3.2.2 Isolamento de α-amilase de saliva humana *89*
3.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO VINHO 90
3.3.1 Concentração de macromoléculas *90*
3.3.2 Separação de polissacarídeos de vinho por cromatografia *90*
3.3.3 Determinação da composição em resíduos glicosídicos *92*
3.4 ESTUDOS DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS POR NEFELOMETRIA 93
3.4.1 Equipamento *93*
3.4.2 Reagentes *93*
3.4.3 Interacções proteína-tanino *93*
3.4.3.1 Interacções entre BSA e procianidinas oligoméricas (PCO) 93
3.4.3.2 Influência da força iónica nas interacções entre BSA e PCO 94
3.4.3.3 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e PCO 94
3.4.3.4 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e vinho 95
3.4.4 Interacção entre proteínas e taninos por nefelometria em contínuo *96*
3.4.4.1 Interacções entre BSA e taninos de grainha e de película de uva 96
3.4.4.2 Interacções entre BSA e fracções de procianidina de diferentes pesos moleculares 97
3.4.4.3 Efeito da concentração de polissacarídeos na interacção entre procianidinas e BSA 97
3.4.4.4 Efeito da concentração de etanol na interacção entre procianidinas e BSA 97
3.4.4.5 Interacções entre BSA e taninos do vinho 98
3.4.4.6 Interacções entre BSA e taninos em vinhos enriquecidos com procianidinas 98
3.5 ESTUDOS DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS UTILIZANDO UM FLUORÍMETRO COMO APARELHO DE MEDIÇÃO DA DISPERSÃO DA LUZ 99
3.5.1 Equipamento *99*
3.5.2 Reagentes utilizados *99*
3.5.3 Estudos sobre a concentração de α-amilase e procianidinas *99*
3.5.3.1 Determinação da concentração de procianidina 100
3.5.3.2 Determinação da concentração de α-amilase 100
3.5.4 Estudos sobre a concentração de IB8c e procianidinas *100*
3.5.5 Efeito dos polissacarídeos do vinho nas interacções entre proteína e tanino *101*
3.5.6 Efeito da força iónica nas interacções entre proteínas e procianidinas *102*
3.5.6.1 Influência da força iónica no efeito dos polissacarídeos sobre as interacções entre proteína e tanino 102
4 RESULTADOS 104

4.1 SÍNTESE, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IB8C E POLISSACARÍDEOS 105
4.1.1 Resumo *106*
4.1.2 Síntese de um péptido salivar da família das PRPs *106*
4.1.2.1 Síntese peptídica em fase sólida de uma PRP básica, a IB8c 106
4.1.2.2 Isolamento de IB8c 109
4.1.3 Polissacarídeos do vinho *112*
4.1.3.1 Isolamento e purificação dos polissacarídeos 112
4.1.3.2 Caracterização das fracções de polissacarídeos em termos da sua composição em resíduos glicosídicos 113
4.2 ESTUDO DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS POR NEFELOMETRIA EM "*BATCH*" 118
4.2.1 Condições experimentais *119*
4.2.2 Influência da concentração de BSA na interacção com PCO *119*
4.2.3 Influência da força iónica na interacção entre BSA e PCO *121*
4.2.4 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e procianidinas oligoméricas *124*
4.2.5 Influência de manoproteínas e pectinas nas interacções de BSA com taninos do vinho e PCO . *130*
4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ESTUDO DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO 132
4.3.1 Desenvolvimento de um método para o estudo das interacções entre proteína e tanino por nefelometria em contínuo *133*
4.3.2 Aplicação do método de nefelometria em contínuo a estudos de interacção entre procianidinas de película e de grainha de uva e a proteína BSA *135*
4.3.3 Estudo por nefelometria em contínuo da interacção entre a BSA e procianidinas de diferentes pesos moleculares *138*
4.3.4 Aplicação da nefelometria em contínuo ao estudo da influência de polissacarídeos na interacção entre proteínas e taninos *140*
4.3.4.1 Comparação do F_{AI} do xantano, dextrano e goma arábica na interacção entre procianidinas (Fracção V) e a BSA 141
4.3.4.2 Efeito do peso molecular das procianidinas no F_{AI} do xantano 143
4.3.5 Aplicação da nefelometria em contínuo ao estudo da influência do etanol na interacção entre proteínas e taninos *145*
4.3.6 Aplicação do método da nefelometria em contínuo a vinhos *147*
4.3.6.1 Aplicação a vinhos com diferentes quantidades de procianidinas adicionadas 148
4.4 APLICAÇÃO DO FLUORÍMETRO NO ESTUDO DAS INTERACÇÕES PROTEÍNA-TANINO 150
4.4.1 Aplicação do fluorímetro em medições nefelométricas *151*
4.4.2 Efeito da concentração de tanino e de proteínas salivares *152*
4.4.2.1 Interacção entre α-amilase e tanino condensado 153
4.4.2.2 Interacção entre IB8c e tanino condensado 154
4.4.2.3 Comparação dos resultados 156
4.4.3 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre proteínas salivares e taninos *157*
4.4.3.1 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre α-amilase e taninos condensados 157
4.4.3.2 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre IB8c e taninos condensados 158
4.4.3.3 Discussão dos resultados 159
4.4.4 Influência da força iónica na interacção entre tanino e proteínas salivares. *161*

4.4.5 Influência da força iónica no efeito dos polissacarídeos sobre as interacções proteína-tanino. 163

4.4.5.1 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção α-amilase-tanino a duas forças iónicas 163

4.4.5.2 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção IB8c-tanino a duas forças iónicas 164

4.4.5.3 Influência da goma arábica na interacção entre proteínas salivares e taninos a duas forças iónicas.. 165

4.4.6 Possível relevância do efeito dos polissacarídeos a nível sensorial..... 167

5 CONCLUSÕES 169

6 REFERÊNCIAS 173

Índice de figuras

FIGURA 1-1: ESTRUTURA DO TIPO: A) C6-C1, ÁCIDOS BENZÓICOS, B) C6-C3-C6, 2-FENILBENZOPIRÍLIO (ESTRUTURA FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES). 24

FIGURA 1-2: ESTRUTURA DE TANINOS HIDROLISÁVEIS: A) TANINO GÁLHICO (PENTAGALOILGLUCOSE), B) TANINOS ELÁGICOS (VESCALAGINA E CASTALAGINA) 29

FIGURA 1-3: ESTRUTURA FUNDAMENTAL DOS PRINCIPAIS FLAVAN-3-OIS (FLAVONÓIDES) PRESENTES NA NATUREZA. 30

FIGURA 1-4: ESTRUTURAS DA (-)-EPIGALHOCATEQUINA 3-O-GALHATO (EGCG) E (-)-EPICATEQUINA 3-O-GALHATO (ECG) 31

FIGURA 1-5: ESTRUTURAS DE PROANTOCIANIDINAS (PROCIANIDINAS) DIMÉRICAS DO TIPO B E TRIMÉRICAS DO TIPO C (TRÍMERO C1) 32

FIGURA 1-6: ESTRUTURA DE UMA PROANTOCIANIDINA DIMÉRICA DO TIPO A (DÍMERO A2). 32

FIGURA 1-7: ESQUEMA GERAL DE PROANTOCIANIDINAS POLIMÉRICAS 33

FIGURA 1-8: MODELO REPRESENTATIVO DAS POSSÍVEIS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E POLIFENÓIS (ADAPTADO DE ASANO *ET AL.* (1982)). 35

FIGURA 1-9: MODELO DA INTERACÇÃO PROPOSTA ENTRE GRUPOS GALOÍLO E RESÍDUOS DE PROLINA. A CADEIA LATERAL DO AMINOÁCIDO N-TERMINAL A SEGUIR AO RESÍDUO DE PROLINA ESTÁ REPRESENTADA POR R, A LIGAÇÃO HIDROGÉNIO ENTRE O GRUPO HIDROXILO DO POLIFENOL E O GRUPO CARBONILO VICINAL À PROLINA ESTÁ REPRESENTADO POR UMA LINHA TRACEJADA. OS ÁTOMOS INDIVIDUAIS ESTÃO REPRESENTADOS POR: CARBONO, PRETO; OXIGÉNIO, PRETO COM CÍRCULO CINZA; AZOTO, CINZA; HIDROGÉNIO, BRANCO (HASLAM 1998). 37

FIGURA 1-10: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PERFIL ANFIFÍLICO DO PÉPTIDO SALIVAR $IB7_{14}$ NA PRESENÇA DO DÍMERO B3 [(-)-CATEQUINA-(4α-8)-(-)-CATEQUINA]. O PERFIL DA PROTEÍNA É MOSTRADO COMO UMA FITA VERDE, A PARTE HIDROFÍLICA É MOSTRADA EM AZUL E A PARTE PÚRPURA REPRESENTA A ZONA DE INTERFACE HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO. A PROCIANIDINA B3 É MOSTRADA POR LINHAS (SIMON *ET AL.* 2003A). 38

FIGURA 1-11: MODELO EM TRÊS FASES DE LIGAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS (PRPS) E POLIFENÓIS, ADAPTADO DE JOBSTL *ET AL.* (2004). 40

FIGURA 1-12: MODELO DE SUPERFÍCIE DA FORMAÇÃO DE TURVAÇÃO COM A ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UMA PROTEÍNA (GLIADINA) E DE UM POLIFENOL (ÁCIDO TÂNICO) NO SISTEMA ÁGUA/ETANOL A 6% E A PH 3,7 (SIEBERT 1999). 41

FIGURA 1-13: MODELO CONCEPTUAL DAS INTERACÇÕES PROTEÍNA-TANINO (SIEBERT *ET AL.* 1996). 42

FIGURA 1-14: CONFORMAÇÃO PREFERIDA POR (-)-EPICATEQUINA, (-)-EPICATEQUINA-O-GALHATO, DÍMERO B2 E DÍMERO B2-3''-O-GALHATO (DE FREITAS *ET AL.* 2001) 44

FIGURA 1-15: INFLUÊNCIA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS PROCIANIDINAS NA SUA CAPACIDADE DE COMPLEXAR COM PRPS (48 μG), α-AMILASE (132 μG) E BSA (60 μG), NUM SISTEMA DE ÁGUA/ETANOL 12% E A PH 5,0 (DE FREITAS *ET AL.* 2002) 46

FIGURA 1-16: RODA DA "PROVA DE BOCA" ("MOUTH-FEEL WHEEL") MOSTRANDO UMA REPRESENTAÇÃO HIERÁRQUICA DE TERMOS QUE PODEM SER USADOS PARA DESCREVER CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS VINHOS TINTOS (GAWEL *ET AL.* 2000). 54

FIGURA 1-17: CURVAS MÉDIAS DE TEMPO-INTENSIDADE PARA A ADSTRINGÊNCIA DE DOIS VINHOS TINTOS (10 ML DE VINHO PROVADOS A INTERVALOS DE 25 SEGUNDOS) EVIDENCIANDO O EFEITO ACUMULATIVO DESTA SENSAÇÃO (LESSCHAEVE *ET AL.* 2005).....55

FIGURA 1-18: RELAÇÃO ENTRE A ADSTRINGÊNCIA SENSORIAL DE SOLUÇÕES CONTENDO POLIFENÓIS E VALORES DE NTU MEDIDOS EM MISTURAS DOS MESMOS POLIFENÓIS E MUCINA. A: ○, ÁCIDO TÂNICO (TA) E □, EXTRACTO DE GRAINHA DE UVA (GSE) (MONTELEONE *ET AL.* 2004); B: □ AMOSTRAS DE VINHOS (CONDELLI *ET AL.* 2005).....56

FIGURA 1-19: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA LOCALIZAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES MAIORITÁRIAS (PEDERSEN *ET AL.* 2002).....57

FIGURA 1-20: COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE DIVERSAS PROTEÍNAS RICAS EM PROLINA ISOLADAS DA SALIVA DA PARÓTIDA. A) PRPS BÁSICAS ALINHADAS DE MODO A EVIDENCIAR AS HOMOLOGIAS ENTRE DIVERSAS PROTEÍNAS (DE SALIENTAR AS SEMELHANÇAS EM TAMANHO E SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS IB7, IB8C E IB9). B) SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS COMPLETA DA PRP SALIVAR IB8C ALINHADA DE MODO A EVIDENCIAR OS MOTIVOS RECORRENTES (KAUFFMAN *ET AL.* 1991). O SÍMBOLO < INDICA UM RESÍDUO N-TERMINAL BLOQUEADO.....60

FIGURA 1-21: CROMATOGRAMAS DAS PROTEÍNAS SALIVARES DE UM INDIVÍDUO ANTES E DEPOIS DE PROVAR UMA SOLUÇÃO MODELO ADSTRINGENTE RICA EM TANINOS. OS PICOS 1, 2 E 3 DIMINUÍRAM DE ÁREA APÓS A PROVA. O PICO 1 É ATRIBUÍDO PELOS AUTORES A UMA PRP GLICOSILADA, O PICO 2 É ATRIBUÍDO A UMA PROTEÍNA SALIVAR POBRE EM PROLINA E O PICO 3 É ATRIBUÍDO A UMA PRP HIDROFÓBICA (KALLITHRAKA *ET AL.* 1998).....62

FIGURA 1-22 MODELO DE UMA PORÇÃO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA MOSTRANDO OS POLISSACARÍDEOS MAIORITÁRIOS. A LAMELA MÉDIA É RICA EM PECTINA E CIMENTA CÉLULAS ADJACENTES (ALBERTS *ET AL.* 2002).....67

FIGURA 1-23: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO SIMPLIFICADO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DA PECTINA: HGA-HOMOGALACTURONANA, RG-I/II: RAMNOGALACTURONANA I/II. PENSA-SE QUE RGI E RGII ESTÃO LIGADOS COVALENTEMENTE A HGA (WILLATS *ET AL.* 2001).....68

FIGURA 1-24: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUEBRA E DEGRADAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DURANTE A MATURAÇÃO DA FRUTA ATRAVÉS DA ACÇÃO DE ENZIMAS (▼ E ▽) (WAKABAYASHI 2000).....68

FIGURA 1-25: REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE α-CICLODEXTRINA (A) E POSSÍVEIS MODOS DE COMPLEXAÇÃO DE FLAVANÓIS COM MOLÉCULAS DE CICLODEXTRINAS (B) (HASLAM 1998).....70

FIGURA 1-26: ESTRUTURA DO XANTANO E VISUALIZAÇÃO DA CONFORMAÇÃO ORDENADA EM SOLUÇÃO (HASLAM 1998).....72

FIGURA 1-27: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ENCAPSULAÇÃO DE UM POLIFENOL (PGG) NOS POROS FORMADOS PELA ESTRUTURA ORDENADA FORMADA NUMA SOLUÇÃO AQUOSA DE XANTANO (HASLAM 1998).....73

FIGURA 1-28: EVOLUÇÃO AO LONGO DO TEMPO DA TURVAÇÃO RESULTANTE DAS INTERACÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS (0,2 $g.L^{-1}$) EM SOLUÇÃO DE ETANOL/ÁGUA 12% (V/V), PH 5,0. PRPS, 48 μG; α-AMILASE, 132 μG; BSA, 60 μG (DE FREITAS *ET AL.* 2002).....78

FIGURA 3-1: ESQUEMA DE FRACCIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DO VINHO. AS FRACÇÕES IDENTIFICADAS COM "+M" CORRESPONDEM A POLISSACARÍDEOS COM MANOSE, ELUÍDOS DA COLUNA DE CONCANAVALINA NA PRESENÇA DE METIL-MANOSE. OS POLISSACARÍDEOS IDENTIFICADOS COM "–M", CORRESPONDEM A

POLISSACARÍDEOS SEM MANOSE QUE NÃO FORAM RETIDOS PELA COLUNA DE CONCANAVALINA. A FRACÇÃO F250 NÃO FOI PASSADA NA COLUNA DE CONCANAVALINA. 91
FIGURA 4-1: ESQUEMA DA SÍNTESE EM FASE SÓLIDA USANDO A ESTRATÉGIA FASTMOC 107
FIGURA 4-2: ESPECTRO MALDI-TOF DO PRODUTO DA SÍNTESE PEPTÍDICA DO IB8C. O PICO MARCADO COMO IB8C CORRESPONDE À ESPÉCIE $[M+H]^{1+}$ E OS RESTANTES PICOS CORRESPONDEM A PÉPTIDOS TRUNCADOS. ALGUNS PICOS FORAM MARCADOS COMO IB8C-X, EM QUE "X" REPRESENTA O NÚMERO DE AMINOÁCIDOS EM FALTA. 109
FIGURA 4-3: CROMATOGRAMA DE LC-ESI-MS DA MISTURA REACCIONAL (PRODUTO BRUTO) DA SÍNTESE DE IB8C. O PÉPTIDO IB8C É ELUÍDO AOS 35 MINUTOS JUNTAMENTE COM ALGUNS PÉPTIDOS TRUNCADOS. 110
FIGURA 4-4: ESPECTRO MALDI-TOF DO PÉPTIDO IB8C APÓS PURIFICAÇÃO. OS PICOS MARCADOS COMO IB8C CORRESPONDEM ÀS ESPÉCIES $[M+H]^{1+}$ E $[M+2H]^{2+}$, E OS PICOS MARCADOS COMO IB8C-X REPRESENTAM OS PÉPTIDOS TRUNCADOS, EM QUE "X" REPRESENTA O NÚMERO DE AMINOÁCIDOS EM FALTA. 111
FIGURA 4-5: CROMATOGRAMAS (GC-EI-MS) DOS DERIVADOS TMS METIL-GLICOSÍDEOS OBTIDOS APÓS METANÓLISE E DERIVATIZAÇÃO DA FRACÇÃO DE POLISSACARÍDEOS F0+M (A) E F50-M (B). OS NÚMEROS EM CADA PICO IDENTIFICAM OS MONOSSACARÍDEOS. 114
FIGURA 4-6: CROMATOGRAMA (GC-EI-MS) DOS DERIVADOS TMS METIL-GLICOSÍDEOS GERADOS APÓS METANÓLISE E DERIVATIZAÇÃO DA FRACÇÃO DE POLISSACARÍDEOS F250. 115
FIGURA 4-7: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BSA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS (PCO A 0,1 MM) EM ETANOL 12% (V/V), TAMPÃO ACETATO 0,1 M A PH 5,0. NA PARTE INFERIOR PODE-SE VER O ESQUEMA DE INTERACÇÃO ENTRE BSA E PCO DE ACORDO COM O MODELO CONCEPTUAL DE SIEBERT (1996; 1999). OS "ESSES" CINZA CORRESPONDEM A PROTEÍNAS COM UM NÚMERO FIXO DE LOCAIS DE LIGAÇÃO A POLIFENÓIS, A PRETO ESTÃO REPRESENTADOS OS POLIFENÓIS COM LOCAIS DE LIGAÇÃO A PROTEÍNAS. 121
FIGURA 4-8: INFLUÊNCIA DA FORÇA IÓNICA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE BSA (6,1 μM) E PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS (PCO, 0,10 MM) EM SOLUÇÃO AQUOSA 12% ETANOL, 0,1M TAMPÃO ACETATO E PH 5,0 122
FIGURA 4-9: INFLUÊNCIA DA FORÇA IÓNICA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE BSA A DUAS CONCENTRAÇÕES DISTINTAS (6,1 E 1,5 μM) E PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS (PCO A 0,10 MM) EM SOLUÇÃO AQUOSA 12% ETANOL, 0,1M TAMPÃO ACETATO, PH 5,0. 123
FIGURA 4-10: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE BSA (6,1 μM) E PCO (0,10 MM) EM SOLUÇÃO AQUOSA COM ETANOL A 12%, TAMPÃO ACETATO 0,1 M E PH 5,0. 124
FIGURA 4-11: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE BSA (6,1 μM) E PCO (0,10 MM) EM SOLUÇÃO AQUOSA COM ETANOL A 12%, TAMPÃO ACETATO 0,1 M E PH 5,0 125
FIGURA 4-12: ESQUEMA QUE ILUSTRA OS MECANISMOS QUE ESTÃO POSSIVELMENTE ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS PELOS CARBOIDRATOS. P: PROTEÍNA, T: TANINO, C: CARBOIDRATO. 129
FIGURA 4-13: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BSA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM TANINOS PRESENTES NO VINHO (VINHO DILUÍDO 1:50 EM SOLUÇÃO AQUOSA ETANOL 12% (V/V), TAMPÃO ACETATO 0,1M A PH 5,0). 130

FIGURA 4-14: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS (A, PECTINA E B, MANOPROTEÍNA) NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE BSA (6,1 μM) E PCO (0,10 MM) OU VINHO DILUÍDO (1:50), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM ETANOL A 12%, TAMPÃO ACETATO 0,1 M E PH 5,0 131
FIGURA 4-15: ESQUEMA DO EQUIPAMENTO DE NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO. ELUENTE: 12% ETANOL (V/V), 0,1 M TAMPÃO ACETATO, PH 5,0. SOLUÇÃO DE PROTEÍNA: BSA EM 12% ETANOL (V/V), 0,1 M TAMPÃO ACETATO, PH 5,0. 133
FIGURA 4-16: CÉLULA DE FLUXO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO 134
FIGURA 4-17: ANÁLISE POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO DA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE PCO (0,27 MM, 1,0 ML.MIN^{-1}) E BSA (0,50 ML.MIN^{-1}). ANÁLISE EM TRIPLICADO 136
FIGURA 4-18: ANÁLISE POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO DA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE TANINOS DE PELÍCULA DE UVA (4,23 G.L^{-1}, 1,0 ML.MIN^{-1}) E BSA (0,5 ML.MIN^{-1}). ANÁLISE EM TRIPLICADO. 137
FIGURA 4-19: ESQUEMA DO EQUIPAMENTO DE NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO, ADAPTADO PARA ESTUDAR A INFLUÊNCIA DE POLISSACARÍDEOS. ELUENTE (A): 12% ETANOL (V/V), 0,1 M DE TAMPÃO ACETATO, PH 5,0; SOLUÇÃO DE PROTEÍNA (B): BSA EM A; SOLUÇÃO C: POLISSACARÍDEO EM A 140
FIGURA 4-20: ANÁLISE POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO DO EFEITO INIBIDOR DA GOMA ARÁBICA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE POLIFENÓIS (FRACÇÃO IV 0,034 G.L^{-1}) E BSA (0,33G.L^{-1}). 141
FIGURA 4-21. ANÁLISE POR NEFELOMETRIA DE FLUXO DO PODER INIBIDOR DO XANTANO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE POLIFENÓIS E BSA (0,33 G.L^{-1}). A: FRACÇÃO III (0,13 G.L^{-1}), B: FRACÇÃO IV (0,034 G.L^{-1}). ESTÃO REPRESENTADAS TRÊS REPETIÇÕES. 143
FIGURA 4-22: ANÁLISE POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO (LINHAS CHEIAS REPRESENTANDO 3 REPETIÇÕES) E POR NEFELOMETRIA EM "BATCH" (LINHA TRACEJADA) DA INFLUÊNCIA DO ETANOL NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE PROCIANIDINAS (FRACÇÃO II, 0,15 MG) E BSA (0,3 MG) 145
FIGURA 4-23: ESTUDO POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BSA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM TANINOS PARA 4 FLUXOS DISTINTOS DE VINHO (NÃO DILUÍDO). 147
FIGURA 4-24: ESTUDO POR NEFELOMETRIA EM CONTÍNUO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BSA NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM TANINOS DE VINHOS ENRIQUECIDOS EM PROCIANIDINAS. FLUXO DE VINHO 0,07 ML.MIN^{-1}. 148
FIGURA 4-25: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM FLUORÍMETRO 152
FIGURA 4-26: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROCIANIDINAS (FIV) NA INTERACÇÃO COM α-AMILASE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, EM SOLUÇÃO 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 5,0 MM, PH 5,0. 153
FIGURA 4-27: A, INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE α-AMILASE NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM TANINOS (PROCIANIDINAS DA FRACÇÃO IV, 15,6 MG.L^{-1}). B, INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE TANINO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM α-AMILASE 22,0 MG.L^{-1}. AS ESCALAS INFERIORES REPRESENTAM AS CONCENTRAÇÕES EM μM (CALCULADAS USANDO UM PESO MOLECULAR MÉDIO DE 1500 G.MOL^{-1} PARA O TANINO E 56000 G.MOL^{-1} PARA α-AMILASE) E AS RAZÕES MOLARES ENTRE PROTEÍNA E TANINO (P/T) E TANINO E PROTEÍNA (T/P). 154
FIGURA 4-28: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE IB8C NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM PROCIANIDINAS (FRACÇÃO IV, 15,6 MG.L^{-1}). 155
FIGURA 4-29: A, INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE IB8C NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM TANINOS (PROCIANIDINAS DA FRACÇÃO IV, 31,2 MG.L^{-1}). B, INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE TANINO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS COM IB8C (3,12 MG.L^{-1}). AS ESCALAS INFERIORES REPRESENTAM AS

CONCENTRAÇÕES EM μM (CALCULADAS USANDO UM PESO MOLECULAR MÉDIO DE 1500 G.MOL^{-1} PARA O TANINO E 5843 G.MOL^{-1} PARA IB8C) E AS RAZÕES MOLARES ENTRE PROTEÍNA E TANINO (P/T) E ENTRE TANINO E PROTEÍNA (T/P). 156

FIGURA 4-30: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 15,6 MG.L^{-1}) E α-AMILASE (22,0 MG.L^{-1}) EM SOLUÇÃO AQUOSA 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0. AS ÁREAS ABAIXO DE 100% FORAM SOMBREADAS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. 158

FIGURA 4-31: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 31,2 MG.L^{-1}) E IB8C (3.12 MG.L^{-1}), EM SOLUÇÃO AQUOSA 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0. AS ÁREAS ABAIXO DE 100% FORAM SOMBREADAS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. 159

FIGURA 4-32: INFLUÊNCIA DA FORÇA IÓNICA NA INTERACÇÃO ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 15,6 MG.L^{-1}) E α-AMILASE (22,0 MG.L^{-1}) E ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 31,2 MG.L^{-1}) E IB8C (3.12 MG.L^{-1}), EM SOLUÇÃO 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0. 161

FIGURA 4-33: EFEITO DA FORÇA IÓNICA (■, 2,0 MM E △, 12,4 MM) NA INIBIÇÃO DA INTERACÇÃO ENTRE A FRACÇÃO IV DAS PROCIANIDINAS E α-AMILASE POR PARTE DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS (AGP0 E MP0) E ACÍDICOS (AGP150 E MP50). AS ÁREAS ABAIXO DE 100% FORAM SOMBREADAS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. PROCIANIDINAS: FIV 15,6 MG.L^{-1}, α-AMILASE: 22,0 MG.L^{-1}, 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0 163

FIGURA 4-34: EFEITO DA FORÇA IÓNICA (■, 2,0 MM E △, 12,4 MM) NA INIBIÇÃO DA INTERACÇÃO ENTRE A FRACÇÃO IV DAS PROCIANIDINAS E IB8C POR PARTE DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS E ACÍDICOS. AS ÁREAS ABAIXO DE 100% FORAM SOMBREADAS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. PROCIANIDINAS: 31,2 MG.L^{-1}, IB8C: 3.12 MG.L^{-1}, 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0 165

FIGURA 4-35: EFEITO DA FORÇA IÓNICA (■, 2,0 MM E △, 12,4 MM) NA INIBIÇÃO DA GOMA ARÁBICA SOBRE A INTERACÇÃO ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 15,6 MG.L^{-1}) E α-AMILASE (22,0 MG.L^{-1}) E ENTRE PROCIANIDINAS (FIV, 31,2 MG.L^{-1}) E IB8C (3.12 MG.L^{-1}), EM SOLUÇÃO AQUOSA 12% ETANOL, TAMPÃO ACETATO 3,1 MM, PH 5,0. AS ÁREAS ABAIXO DE 100% FORAM SOMBREADAS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. 166

Índice de tabelas

TABELA 1-1: TEOR EM POLIFENÓIS DE DIVERSOS ALIMENTOS (SCALBERT *ET AL.* 2000; MACHEIX *ET AL.* 2005). 26

TABELA 1-2: ACTIVIDADE TANANTE ESPECÍFICA (ATE) DE PROCIANIDINAS (0,4 MG) COM PRPS SALIVARES HUMANAS (0,132 MG) (EM ÁGUA/ETANOL 12% A PH 5,0) (DE FREITAS *ET AL.* 2001). 43

TABELA 1-3: VALORES DE PRECIPITAÇÃO MÁXIMA E DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NECESSÁRIA PARA ATINGIR A PRECIPITAÇÃO MÁXIMA, NUM SISTEMA DE PGG-PROTEÍNA, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE NACL. ADAPTADO DE LUCK *ET AL.* (1994). 50

TABELA 1-4: EFEITOS INIBIDORES DE DIVERSOS CARBOIDRATOS NA PRECIPITAÇÃO DE PGG POR GELATINA (LUCK *ET AL.* 1994). 71

TABELA 3-1: CONDIÇÕES DE FRACCIONAMENTO DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS E AS QUANTIDADES DE PROCIANIDINAS OBTIDAS DE CADA FRACÇÃO. 85

TABELA 3-2: FLAVAN-3-ÓIS MAIORITÁRIOS IDENTIFICADOS POR LSI-MS NAS FRACÇÕES DE GRAINHA DE UVA ELUÍDAS DA COLUNA DE GEL TOYOPEARL. 85

TABELA 4-1: QUANTIDADES (MG/L_{VINHO}) DE CADA UMA DAS FRACÇÕES DE POLISSACARÍDEOS OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA A PARTIR DE 10 L DE VINHO TINTO E 5 L DE VINHO BRANCO. 112

TABELA 4-2: COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS (PERCENTAGEM EM MASSA) DAS FRACÇÕES DE POLISSACARÍDEOS ISOLADAS DO VINHO. 116

TABELA 4-3: CONSTANTES DE INIBIÇÃO DE AGREGAÇÃO (K_{AI}) ENTRE BSA E PCO PARA VÁRIOS CARBOIDRATOS NEUTROS E IÓNICOS. 127

TABELA 4-4: CONCENTRAÇÃO DAS FRACÇÕES DE PROCIANIDINAS DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES NECESSÁRIAS À OBTENÇÃO DE VALORES DE NTU DA MESMA ORDEM DE GRANDEZA, PARA UMA DADA CONCENTRAÇÃO DE BSA (0,33 G.L^{-1}). 138

TABELA 4-5: FACTOR DE INIBIÇÃO DE AGREGAÇÃO (F_{AI}) DOS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS. FV: 0,050 G.L^{-1}; BSA: 0,33 G.L^{-1}. 142

TABELA 4-6: FACTOR DE INIBIÇÃO DE AGREGAÇÃO (F_{AI}) DO XANTANO SOBRE A INTERACÇÃO DE BSA (0,33 G.L^{-1}) COM PROCIANIDINAS DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES. 144

Lista de abreviaturas e símbolos

2-O-Me-Fuc: 2-O-Metil-Fucose

AceA: ácido acérico

AG: Arabinogalactana

AGP: arabinogalactana-proteína

ATE. Actividade Tanante Específica

Boc: *terc*-butoxicarbonilo

BSA: Albumina Sérica Bovina

Dha: ácido 3-desoxi-D-*lixo*-2-heptulosárico

EGCG: Epigalhocatequina galhato

ECG: Epicatequina galhato

EC_{16}-C: epicatequina$_{16}$-(4-8)-catequina, uma procianidina heptadecamérica com um peso molecular de 4930, isolada de sorgo

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

FTIR. Fourier transform infrared (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)

GalA: ácido galacturónico

GC-EI-MS: Espectrometria de massa de impacto electrónico associada a cromatografia gasosa

GlcA: ácido glucurónico

GP: Glicoproteína

HBTU: Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

HOBt: 1-Hidroxibenzotriazole

d.i.: diámetro interno

Kdo: ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octulosónico

LSIMS: espectrometria de massa de iões secundários em matriz líquida

m/z: razão massa/carga

M^+: ião molecular

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption/ionization-Time of flight

MP: Manoproteína

NTU: Unidade de turbidez nefelométrica

Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil

PCO: Procianidinas oligoméricas

PGG: Pentagaloilglucose

pI: Ponto isoeléctrico

PRP: Proteína Rica em Prolina

RGII: Ramnogalacturonana do tipo II

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RP-HPLC: Cromatografia liquida de alta eficiência em fase reversa

Rpm: Rotações por minuto

tbu: t-butilo

TFA: Ácido Trifluoroacético

TMS: Trimetilsilil

trt: Tritil

Códigos de uma letra e de três letras dos aminoácidos:

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

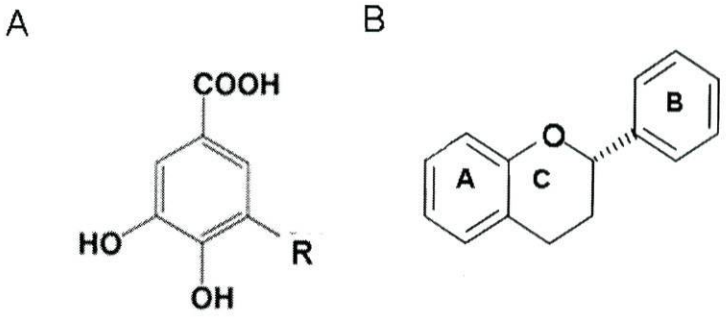
1 INTRODUÇÃO

1.1 Polifenóis

Os polifenóis constituem um dos grupos de compostos mais abundantes nas plantas. São considerados como uma das principais classes de metabolitos secundários com funções nas plantas que vão desde a pigmentação ao crescimento, passando pela defesa das plantas contra ataques microbiológicos e predadores (Naczk *et al.* 2006).

Os polifenóis são substâncias que contêm dois ou mais grupos fenólicos (grupo hidroxilo ligado a anel benzénico), e que podem conter outros substituintes na sua estrutura tais como açúcares ou ácidos orgânicos.

São conhecidos milhares de compostos fenólicos nas plantas que podem ser divididos em diversas classes de acordo com a sua estrutura química. Entre estas classes podem-se encontrar compostos simples com apenas um anel benzénico polihidroxilado tais como os ácidos benzóicos, com uma estrutura do tipo C6-C1 (Figura 1-1A) e compostos com estruturas mais complexas tais como os flavonóides com uma estrutura do tipo C6-C3-C6 (Figura 1-1B), polihidroxilados nos anéis A e B.



R = H..... ácido protocatecuico
R = OH..... ácido gálhico

Figura 1-1: Estrutura do tipo: A) C6-C1, ácidos benzóicos, B) C6-C3-C6, 2-fenilbenzopirílio (estrutura fundamental dos flavonóides).

O grupo dos flavonóides é o mais diversificado em termos estruturais e subdivide-se em diversas classes tais como as antocianidinas, flavonas, chalconas, flavanonas, flavonois, dihidroflavonois, flavan-4-ois, flavan-3,4-diois e flavan-3-ois.

Esta última classe é provavelmente a mais abundante porque constitui a unidade fundamental dos taninos condensados, muito abundantes na natureza, cuja estrutura será descrita posteriormente.

1.1.1 Importância dos polifenóis na alimentação

1.1.1.1 Características sensoriais

Os compostos polifenólicos contribuem para as qualidades sensoriais dos alimentos, nomeadamente para a sua cor e sabor.

As antocianinas são os principais pigmentos de flores e frutos e são responsáveis pela maioria das cores vermelha, azul, violeta, púrpura e preta das plantas. Algumas flavonas, flavonois e chalconas contribuem para os tons creme e amarelados de flores e frutos. As antocianinas têm um grande interesse comercial dado que são utilizadas como corantes alimentares vermelhos e violetas nos alimentos (E163).

Em determinados alimentos, como por exemplo no vinho, as antocianinas sofrem alterações estruturais durante o envelhecimento, por reacções de complexação, de adição e de oxidação-redução. Estas reacções levam à formação de compostos com diferentes características cromáticas, com as consequentes alterações da cor do vinho (Singleton *et al.* 1969; Somers 1971).

No que respeita ao sabor, os compostos polifenólicos contribuem para a adstringência dos alimentos e em certos casos para o sabor amargo (Lesschaeve *et al.* 2005).

Por outro lado, a natureza polifenólica destes compostos permite-lhes facilmente sequestrar radicais livres e serem oxidados a quinonas. Por esta razão podem desempenhar um papel importante como antioxidantes nos alimentos prevenindo ou abrandando a oxidação responsável pela alteração das características sensoriais, nutricionais e pela possível formação de compostos nocivos para a saúde (Moure *et al.* 2001).

Nalgumas bebidas, tal como a cerveja, sumos de fruta ou vinhos brancos, uma das mais frequentes causas de formação de turvação é a formação de agregados proteína-polifenol. Esta turvação ocorre ao longo do tempo em produtos embalados e pode levar a uma rejeição por parte do consumidor. Existem tratamentos (adsorção, ultrafiltração, colagens) que se podem aplicar a estas bebidas de modo a retardar a formação de turvação por um período superior ao do prazo de validade do produto (Siebert 2006).

1.1.1.2 Consumo diário de polifenóis

Podem-se encontrar diversos alimentos de origem vegetal ricos em compostos polifenólicos, tais como cereais (cevada, aveia, milho, etc.), frutos (uva, maçã, romã, citrinos, etc.), legumes (alface, espinafre, etc.) e em produtos derivados de vegetais tais como sumos de fruta, vinho, cerveja, café, cidra, chocolate e chá (Scalbert *et al.* 2000; Manach *et al.* 2004; Naczk *et al.*

2006). Assim, dependendo dos hábitos alimentares, uma pessoa pode consumir de 100 mg até vários gramas de polifenóis diários (Tabela 1-1), principalmente se tiver uma alimentação rica em frutos e legumes (Macheix *et al.* 2005).

Tabela 1-1: Teor em polifenóis de diversos alimentos (Scalbert *et al.* 2000; Macheix *et al.* 2005).

Alimento	*Teor em polifenóis (mg)*
Sumo de laranja (100 ml)	22 a 75
Vinho tinto (125 ml)	100 a 225
Chá preto (200 ml)	138 a 200
Café (200 ml)	150 a 179
Maçã (1 peça de 150g)	3 a 300
Pêssego (1 peça de 150g)	15 a 200
Chocolate negro (20g)	100 a 200
Azeite (1 colher)	6

1.1.1.3 Impacto dos polifenóis na saúde humana

O carácter antioxidante dos compostos polifenólicos permite-lhes neutralizar as espécies reactivas de oxigénio em grande parte resultantes da peroxidação lipídica (Halliwell *et al.* 1995).

Esta propriedade confere aos polifenóis uma vasta actividade biológica, destacando-se a diminuição do risco de doença cardiovascular (através da diminuição da oxidação de LDL, descida da pressão arterial e uma diminuição do nível de colesterol plasmático) (Green *et al.* 1986; Santos-Buelga *et al.* 2000; Porto *et al.* 2003), a redução do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (Orgogozo *et al.* 1997), a prevenção da ocorrência de alguns tipos de cancro (Santos-Buelga *et al.* 2000) e o retardamento do envelhecimento celular (Howitz *et al.* 2003).

Estas propriedades benéficas são sobretudo atribuídas aos polifenóis de baixo peso molecular que podem ser mais facilmente absorvidos, transportados e metabolizados no organismo, sendo por esta razão biodisponíveis. Os polifenóis de alto peso molecular têm, em princípio, maior dificuldade em serem absorvidos devido à sua dimensão e devido à sua capacidade de interagir com proteínas, permanecendo no tracto gastrointestinal, formando complexos de grandes dimensões com as proteínas (Hagerman 2001).

1.1.1.4 Impacto dos polifenóis na digestão

Os polifenóis mais polimerizados (denominados taninos) são os que apresentam maior afinidade para interagir com as proteínas e por essa razão têm a capacidade de se ligarem a enzimas digestivas inibindo o seu efeito no processo digestivo (efeito anti nutricional). Os polifenóis têm a capacidade de inibir enzimas ligadas ao metabolismo de carboidratos (α-amilase, α-glucosidades), de lípidos (lipase pancreática e gástrica) e de proteínas (tripsina e proteases diversas), podendo também complexar as proteínas da dieta que deixam de estar acessíveis às proteases (McDougall *et al.* 2005b).

Na produção animal, os taninos são frequentemente referidos como factores antinutricionais, devido ao seu impacto negativo. O seu consumo leva tipicamente a perdas de peso, menor produção de leite ou lã, menor consumo de ração e menor digestibilidade dos alimentos. Os taninos podem tornar os alimentos menos digestíveis por se ligarem a componentes desses mesmos alimentos, ou por inibirem as enzimas envolvidas na digestão. Nalguns animais alimentados com taninos observaram-se alguns efeitos tóxicos tais como úlceras e danos na mucosa gastrointestinal. No entanto, alguns taninos podem ter efeitos positivos nalguns animais: podem reduzir a quantidade de proteína que é digerida no rúmen e aumentar assim a quantidade de proteína disponível para digestão no intestino delgado, podem eliminar parasitas e podem diminuir o timpanismo espumoso (Mueller-Harvey 2006).

Num estudo recente foi sugerido que existe uma perda de azoto nas fezes de animais alimentados com taninos. No entanto, esta perda parece ser devida à complexação de taninos com proteínas salivares, complexos estes que são posteriormente eliminados nas fezes. Este fenómeno poderá ser vantajoso, dado que a formação e eliminação dos complexos proteína salivar-tanino pode reduzir o potencial efeito tóxico dos taninos no sistema gastrointestinal, e, por outro lado, do ponto de vista nutricional é mais vantajoso perder proteínas salivares que as proteínas da dieta, que contém maiores níveis de aminoácidos essenciais (Skopec *et al.* 2004).

Em geral, os polifenóis com menor peso molecular apresentam alguns efeitos benéficos devido aos seus efeitos anti-oxidantes e apresentam biodisponibilidade. Por outro lado, polifenóis de maiores dimensões, como os taninos, são mais dificilmente absorvidos e apresentam efeitos nocivos, sendo considerados como "anti-nutritivos". É consensual que as proteínas salivares, que complexam facilmente os taninos, poderão constituir a primeira linha de defesa contra o efeito negativo dos taninos na dieta (Skopec *et al.* 2004; Shimada 2006).

1.2 Taninos

O termo "tanino" foi usado pela primeira vez para descrever o material responsável pela formação de couro a partir de peles animais. A definição fitoquímica de tanino foi proposta em 1962: *"todos os compostos fenólicos solúveis em água, com um peso molecular situado entre 500 e 3000 Da, cujas principais propriedades (para além das reacções características dos compostos fenólicos) são a de formarem complexos insolúveis com os alcalóides, gelatina e outras proteínas"* (Bate-Smith *et al.* 1962).

Desde então têm vindo a ser descobertas estruturas polifenólicas com pesos moleculares muito elevados na ordem das dezenas de milhares de Dalton (Haslam 1998).

A propriedade de precipitar as proteínas, mais particularmente as proteínas salivares presentes na cavidade oral, está na origem das propriedades adstringentes dos alimentos ricos em taninos.

Classicamente distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados.

1.2.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são, como o nome indica, passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem. São constituídos por uma parte não fenólica polialcoólica (normalmente a glucose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e glicósidos) e por uma parte fenólica (e.g. o ácido gálhico) ligados através de uma ligação ester (Khanbabaee *et al.* 2001).

Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em taninos gálhicos (galhotaninos), em que a parte fenólica é o ácido gálhico, e taninos elágicos (elagitaninos), em que a parte fenólica é o ácido hexahidroxidifénico (que origina ácido elágico). A pentagaloilglucose (PGG) e a vescalagina são exemplos de taninos gálhicos e elágicos, respectivamente (Figura 1-2).

Estes taninos são abundantes na classe das dicotiledóneas. Algumas árvores desta classe, como o castanheiro e o carvalho são utilizadas como fontes industriais de tanino. O "ácido tânico", um nome genérico correspondente a uma mistura de vários taninos gálhicos, é extraído de folhas e galhas de arbustos do génereo *Rhus* (sumagre), das vagens de *Caesalpinia spinosa* (tara) e das galhas de várias espécies de carvalho (Clifford *et al.* 2000).

Os taninos gálhicos são extremamente raros na nossa dieta (Clifford 1997) e os taninos elágicos encontram-se apenas em grupos restritos de alimentos tais como framboesa, morango, castanha, avelã, caju e pistachio (Clifford *et al.* 2000). Estes taninos foram

encontrados em partes não comestíveis de alimentos tais como as folhas das plantas ou, no caso da avelã, na pele, que representa apenas uma pequena parte do total comestível, pelo que o consumo deste tipo de taninos é provavelmente muito baixo. Também se podem encontrar taninos elágicos em vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho, como resultado da sua extracção da madeira durante o seu estágio em barricas (Clifford *et al.* 2000).

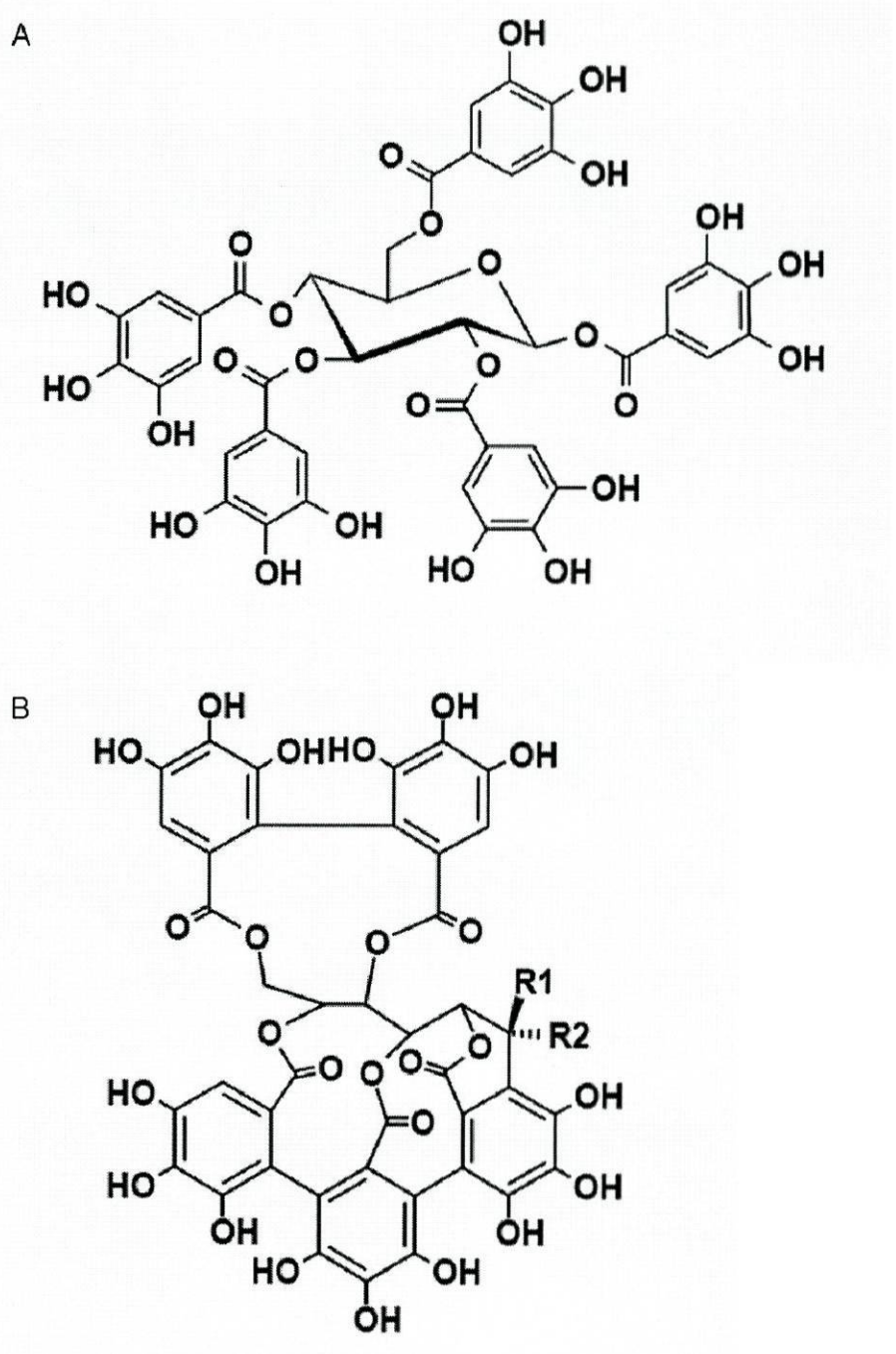
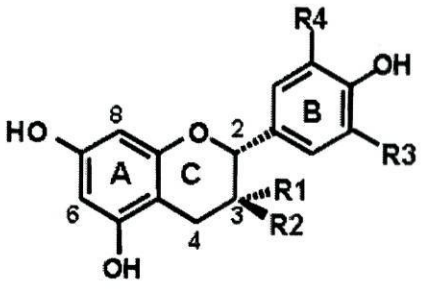


Figura 1-2: Estrutura de taninos hidrolisáveis: A) tanino gálhico (pentagaloilglucose), B) taninos elágicos (vescalagina e castalagina).

1.2.2 Taninos condensados

Os taninos condensados são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-ol (Figura 1-3). Quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas (reacção de Bate-Smith), daí que também sejam conhecidos por proantocianidinas.



Afzelequinas:
R1 = H, R2 = OH, R3 = H, R4 = H.....(+)-afzelequina
R1 = OH, R2 = H, R3 = H, R4 = H.....(-)-epiafzelequina

Catequinas:
R1 = H, R2 = OH, R3 = H, R4 = OH.....(+)-catequina
R1 = OH, R2 = H, R3 = H, R4 = OH.....(-)-epicatequina

Galhocatequinas
R1 = H, R2 = OH, R3 = OH, R4 = OH.....(+)-galhocatequina
R1 = OH, R2 = H, R3 = OH, R4 = OH.....(-)-epigalhocatequina

Figura 1-3: Estrutura fundamental dos principais flavan-3-ois (flavonóides) presentes na natureza.

A estrutura dos principais flavan-3-ols presentes na natureza varia de acordo com o número de grupos hidroxilo no anel B e com a estereoquímica do carbono 3 do heterociclo C.

Assim, dependendo da estereoquímica do carbono 3, podemos ter, por exemplo a (+)-catequina ou a (-)-epicatequina, e dependendo do grau de hidroxilação do anel B podemos ter (epi)afzelequina (monohidroxilado), (epi)catequina (dihidroxilado) ou (epi)galhocatequina (trihidroxilado) (Figura 1-3).

Os flavanóis com a configuração 2S, tais como a (-)-catequina e a (+)-epicatequina, são relativamente raros e usa-se o prefixo "ent" (de enantiómero) na sua denominação (ent-catequina, e ent-epicatequina, por exemplo) (Haslam 1998).

As unidades fundamentais das proantocianidinas estão geralmente ligadas entre si por ligações do tipo C-C entre o C4 de um flavanol e o C8 ou C6 do flavanol seguinte. O grau de polimerização pode variar, podendo-se encontrar oligómeros (dímeros a hexâmeros) e polímeros (que podem atingir graus de polimerização muito elevados). De facto encontraram-se na película de uva proantocianidinas com cerca de 80 unidades de flavanol (Souquet *et al.* 1996).

As unidades de flavan-3-ol podem ainda estar ligadas a grupos acilo ou glicosilo (Santos-Buelga *et al.* 2000). O substituinte acilo mais comum é derivado do ácido galhico que forma um ester com o grupo hidroxilo na posição C3 do flavan-3-ol (Figura 1-4).

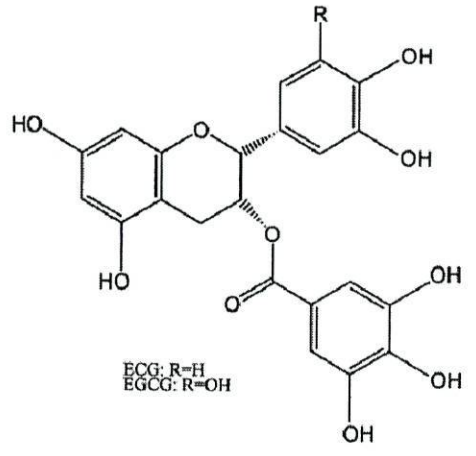


Figura 1-4: estruturas da (-)-epigalhocatequina 3-O-galhato (EGCG) e (-)-epicatequina 3-O-galhato (ECG)

A nomenclatura das proantocianidinas começou por ser feita através de um sistema alfanumérico, em que um número ia sendo adicionado à letra A, B, ou C (conforme o tipo de ligação interflavânica), à medida que as proantocianidinas iam sendo descobertas.

As proantocianidinas diméricas designam-se pela letra B e as triméricas pela letra C (Figura 1-5). Estas proantocianidinas encontram-se ligadas entre si por ligações C4-C8 ou C4-C6.

No entanto, introduziu-se um novo sistema em que as unidades monoméricas são designadas pelo nome dos flavanóis correspondentes e a ligação interflavânica e a sua direccionalidade são indicadas entre parênteses com uma seta. Assim, o dímero B1 também pode ser designado por (-)-epicatequina-(4β→8)-(+)-catequina.

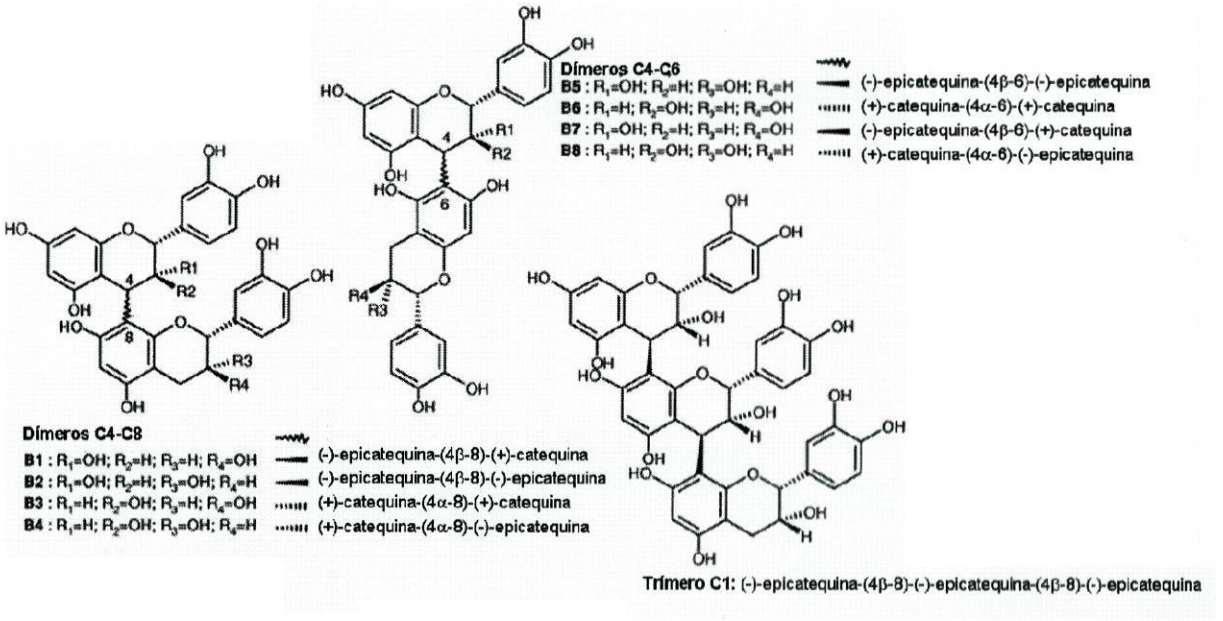
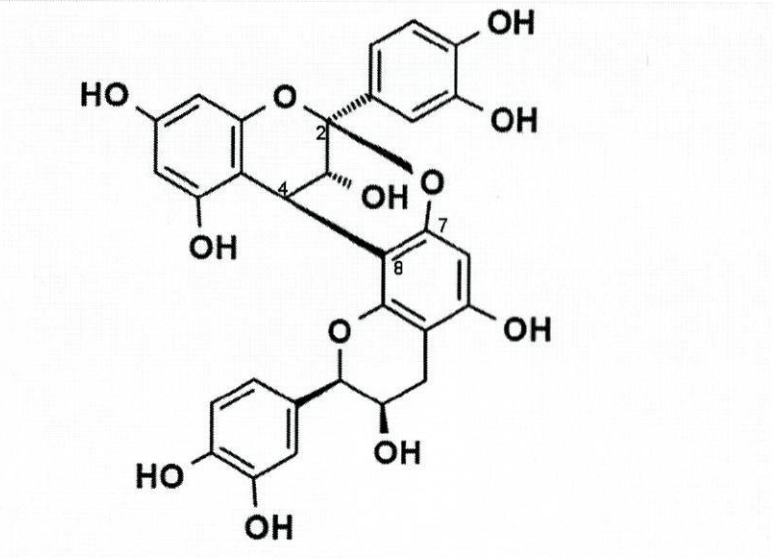


Figura 1-5: Estruturas de proantocianidinas (procianidinas) diméricas do tipo B e triméricas do tipo C (trímero C1).

As proantocianidinas do tipo A apresentam unidades estruturais duplamente ligadas através da ligação do tipo C4-C8 ou C4-C6 e de uma ligação éter adicional entre o C2 de uma unidade e o C5 ou C7 da unidade seguinte (Figura 1-6).



Proantocianidina A2
(-)-epicatequina-(2β-7,4β-8)-(-)-epicatequina

Figura 1-6: Estrutura de uma proantocianidina dimérica do tipo A (dímero A2).

A maioria das proantocianidinas de origem vegetal encontra-se sob a forma de oligómeros e polímeros de alto peso molecular. Podem ser constituídas apenas por um tipo de subunidade (só (-)-epicatequina, por exemplo), ou podem conter diversos tipos de unidades e de ligações

interflavânicas (C4-C6 ou C4-C8), dando origem a estruturas complexas como aquela que podemos ver no esquema da Figura 1-7.

O grau de hidroxilação do anel B permite classificar as proantocianidinas em *propelargonidinas* (constituídas por unidades de afzelequinas), *procianidinas* (constituídas por unidades de catequinas) e em *prodelfinidinas* (constituídas por unidades de galhocatequinas).

A análise deste tipo de proantocianidinas nos alimentos é difícil devido à enorme variedade de estruturas existentes e à escassez de técnicas analíticas que permitam a sua separação e quantificação. Por esta razão a sua dosagem nos alimentos limita-se às estruturas mais simples como os monómeros, dímeros e alguns trímeros, apesar de os polímeros constituírem a maioria dos polifenóis presentes nas plantas (Cheynier 2005).

As proantocianidinas são muito mais comuns na dieta do que os taninos hidrolisáveis. Estas estão presentes em concentrações relativamente importantes em frutos (uvas, maças, etc) bebidas derivadas, no cacau e chocolate, entre outros (Santos-Buelga *et al.* 2000).

As proantocianidinas constituem os polifenóis maioritários das uvas encontrando-se na sua maioria nas grainhas, nas películas e no engaço. As proantocianidinas da grainha tem um grau de polimerização médio de entre 2 a 16, enquanto que na película podem apresentar graus de polimerização entre 3 e 83 (Souquet *et al.* 1996).

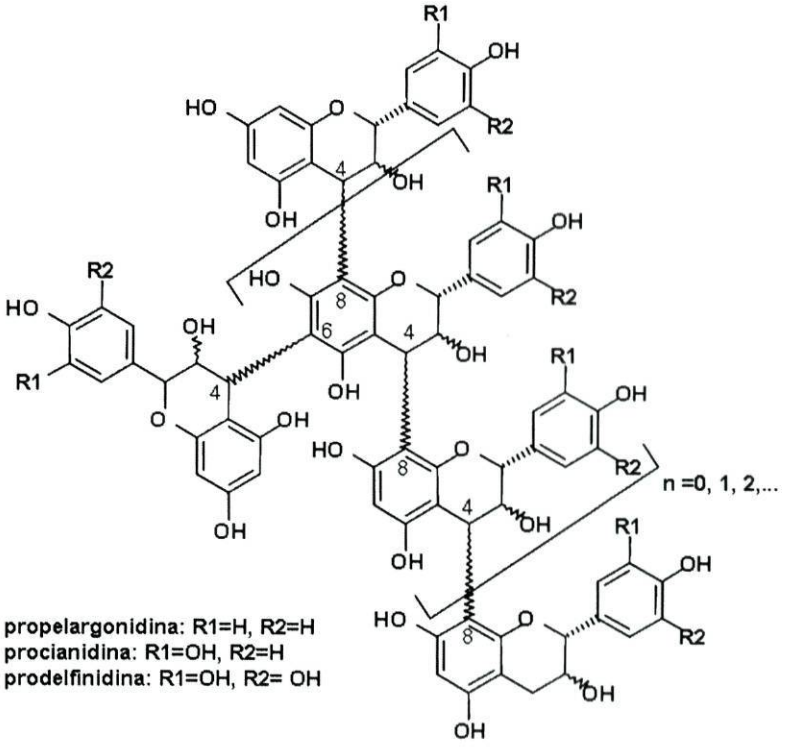


Figura 1-7: Esquema geral de proantocianidinas poliméricas

1.3 Interacções entre proteínas e taninos

A interacção entre taninos e proteínas tem sido estudada por diversos autores que têm proposto diversos modelos de interacção. Nestes modelos os aspectos mais discutidos são o tipo de ligação (hidrofóbica e/ou por pontes de hidrogénio) envolvida na formação de complexos e o mecanismo de formação de agregados de proteína–tanino que podem levar eventualmente à formação de precipitados. As interacções proteína-tanino são afectadas por diversos factores estruturais e pelas condições do meio. Estes aspectos irão são ser discutidos nas secções seguintes.

1.3.1 Tipos de interacção

O núcleo polifenólico tem uma estrutura molecular favorável à interacção com proteínas:

- Apresenta zonas apolares, como o anel benzénico, que podem interagir com zonas apolares das proteínas, tais como as cadeias laterais de aminoácidos como a alanina, leucina, isoleucina, prolina, etc;
- Tem zonas hidrofílicas, como os grupos hidroxilo, que podem participar em interacções hidrogénio com os grupos carbonilo e amina da proteína (Figura 1-8).

Assim, as interacções proteína-tanino podem envolver sobretudo interacções hidrofóbicas e ligações de hidrogénio (Haslam 1996), sendo as ligações iónicas menos importantes, dado que os polifenóis são ácidos fracos, com pKa de 9-10 e praticamente não apresentam grupos carregados a valores de pH neutros e ácidos (Oh *et al.* 1980; Vernhet *et al.* 1996).

Na presença de água, as regiões apolares de proteínas e polifenóis tendem a associar-se através de ligações Van Der Walls, diminuindo assim a superfície de zonas apolares expostas à água. As moléculas de água que estavam associadas às zonas apolares de uma forma ordenada ficam livres para se juntarem ao grosso do solvente, dando assim origem ao chamado efeito hidrofóbico.

As ligações hidrogénio são forças que, apesar de serem relativamente fracas individualmente, no seu conjunto são importantes para a estabilização do complexo tanino-proteína. Por outro lado, a presença de grupos capazes de fazerem ligações de hidrogénio com o solvente (solução aquosa), são grupos solubilizadores do soluto. Por isso, a formação de agregados proteína-tanino em sistemas aquosos depende da redução do número de ligações hidrogénio com o solvente. A energia da interacção entre proteínas e taninos depende assim do balanço energético entre as novas ligações que se formam e as ligações quebradas. O ganho de entropia devido à libertação de moléculas de água para o meio durante a complexação, onde

podem participar em interacções de hidrogénio com outras moléculas de água, favorece a ocorrência deste tipo de interacções.

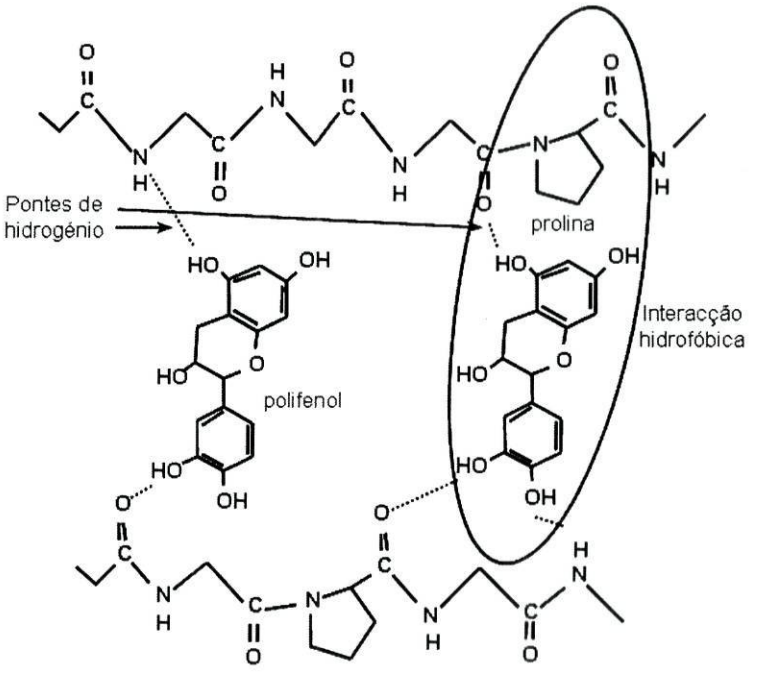


Figura 1-8: Modelo representativo das possíveis interacções entre proteínas e polifenóis (adaptado de Asano *et al.* (1982)).

Diversos autores verificaram a existência de interacções hidrofóbicas em complexos entre proteínas e taninos, como irá ser discutido nos parágrafos seguintes. Muitos destes estudos foram efectuados em proteínas ricas em prolina ou PRPs.

A presença de interacções hidrofóbicas foi observada entre a EGCG e a β-caseína (Jobstl *et al.* 2006), entre EGCG e uma histatina (Wroblewski *et al.* 2001) e entre taninos condensados de grainha de uva e diversas proteínas (gelatina e poli-aminoácidos de lisina, prolina e hidroxiprolina, entre outros) (Oh *et al.* 1980).

O grupo de Hatano *et al.* (1996; 1999) estudou por RMN as interacções entre flavan-3-ois (catequina e dímeros de catequina) e aminoácidos (prolina, hidroxiprolina) e diversos péptidos contendo prolina. Os resultados obtidos por estes autores parecem indicar a ocorrência de fortes interacções hidrofóbicas entre os polifenóis e resíduos hidrofóbicos dos péptidos. Estes autores não verificaram preferência dos polifenóis pela prolina em péptidos contendo este aminoácido, mas sim por resíduos hidrofóbicos conformacionalmente acessíveis.

Outros estudos por RMN que a seguir se descrevem mostraram a existência de interacção hidrofóbica do tipo "*stacking*" do anel benzénico do polifenol com a face do anel pirrolidina da prolina (Figura 1-9) (Murray *et al.* 1994b; Baxter *et al.* 1997; Charlton *et al.* 2002b):

- Murray *et al.* (1994b) investigaram a interacção entre um polifenol (PGG) e dois péptidos sintéticos (com 19 e 22 resíduos) que apresentam a sequência repetitiva típica da PRP salivar de rato, em água/dimetilsulfóxido (9:1, v:v). O estudo mostrou que os locais de ligação maioritários são os resíduos de prolina bem como a ligação amida e o aminoácido precedentes.
- Baxter *et al.* (1997) efectuaram estudos de RMN em que se titulou uma série de polifenóis (monómero e dímero de procianidina, galoilglucoses e galhato de propilo) com um péptido de 19 aminoácidos correspondente a um fragmento de uma PRP salivar de rato, usando água/dimetilsulfóxido (90%:10%), como solvente.
- Charlton *et al.* (2002b) estudaram a estrutura do complexo formado entre um heptapéptido rico em prolina e o polifenol EGCG, usando água como solvente. Verificaram que as prolinas estão quase sempre envolvidas em interacções hidrofóbicas do tipo "*stacking*" com uma forte preferência para envolver a primeira prolina de um grupo de duas.
- Num outro estudo, Charlton *et al.* (2002a) observaram uma forte interacção entre PGG e diversas proteínas (péptidos ricos em prolina e bradiquinina). Segundo estes autores, a ligação intermolecular entre proteínas ricas em prolina e diversos polifenóis é, mais uma vez, dominada pelo "*stacking*" dos anéis polifenólicos com superfícies planares hidrofóbicas dos aminoácidos e é fortalecida pela existência de múltiplas ligações envolvendo diversos anéis aromáticos e vários locais hidrofóbicos das proteínas. Apesar de a prolina ser um importante local de ligação, também se verificam interacções com as cadeias laterais de outros aminoácidos (a fenilalanina que é um aminoácido hidrofóbico e a arginina que é carregada positivamente) em histatinas e num fragmento de uma proteína acídica.

Resumindo, estes estudos indicam que os locais de ligação maioritários em péptidos ricos em prolina são os resíduos de prolina, e que um local particularmente favorecido é o primeiro resíduo de prolina de uma sequência Pro-Pro. O resíduo de prolina pode ser considerado como um bom local de ligação já que proporciona uma superfície plana, rígida e hidrofóbica favorável para interacções com outras superfícies planas e hidrofóbicas como sejam os anéis benzénicos.

Outro factor que pode ser importante é o facto do carbonilo das amidas terciárias ser um aceitador de hidrogénio mais eficiente que o grupo carbonilo de amidas secundárias ou primárias, pelo que a ligação hidrofóbica envolvendo amidas terciárias (como é o caso das proteínas com prolina) poderá ser fortalecida por ligações hidrogénio (Haslam 1998).

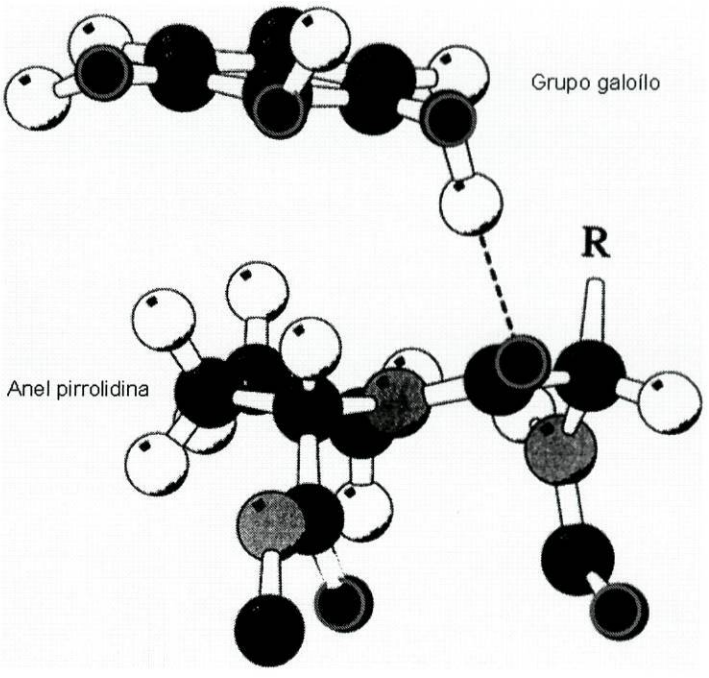


Figura 1-9: Modelo da interacção proposta entre grupos galoílo e resíduos de prolina. A cadeia lateral do aminoácido N-terminal a seguir ao resíduo de prolina está representada por R, a ligação hidrogénio entre o grupo hidroxilo do polifenol e o grupo carbonilo vicinal à prolina está representado por uma linha tracejada. Os átomos individuais estão representados por: Carbono, preto; Oxigénio, preto com círculo cinza; Azoto, cinza; Hidrogénio, branco (Haslam 1998).

No entanto, outros estudos entre Albumina Sérica Bovina (BSA) e (-)-epicatequina (Frazier *et al.* 2006) e entre o dímero B3 [(+)-catequina-(4α-8)-(+)-catequina] e um fragmento de PRP (Simon *et al.* 2003a), parecem sugerir que a ligação entre proteínas e taninos envolve sobetudo ligações de hidrogénio.

De facto, Simon *et al.* (2003a), observaram em estudos por RMN (num solvente composto por água contendo 12% de etanol) e modelação molecular que o dímero B3 se ligou preferencialmente à parte hidrofílica de um fragmento de 14 aminoácidos do péptido IB7 (um fragmento de uma PRP salivar humana), sugerindo que as principais forças que governam a associação entre proteína e tanino são de ligações hidrogénio entre os grupos carbonilo e amida da proteína e os grupos hidroxilo do polifenol (Figura 1-10). Os autores não observaram "stacking"ou outro tipo de ligações hidrofóbicas ao contrário dos estudos referidos anteriormente (Murray *et al.* 1994b; Hatano *et al.* 1996; Baxter *et al.* 1997; Hatano

et al. 1999; Charlton *et al.* 2002b) e atribuem o resultado aparentemente contraditório ao uso de dimetilsulfóxido por parte de alguns destes autores, com características de polaridade diferentes dos sistemas aquosos.

Contudo, os solventes usados por alguns destes autores são semelhantes aos usados por Simon *et al.* De facto, o grupo de Hatano usa um sistema aquoso com 10-20% CD_3OD (Hatano *et al.* 1996; Hatano *et al.* 1999), e, alguns dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Haslam foram efectuados em sistema aquoso (Charlton *et al.* 2002b), apontando para interacções do tipo hidrofóbico.

Por outro lado, apesar de todos estes autores terem usado péptidos salivares ricos em prolina, os péptidos usados foram diferentes em tamanhos e sequências de aminoácidos.

De facto, os resultados obtidos por Hatano *et al.* (1996; 1999) parecem indicar que os polifenóis ligam preferencialmente aos resíduos de aminoácidos que estão mais expostos, o que depende da estrutura e sobretudo da conformação da cadeia peptídica.

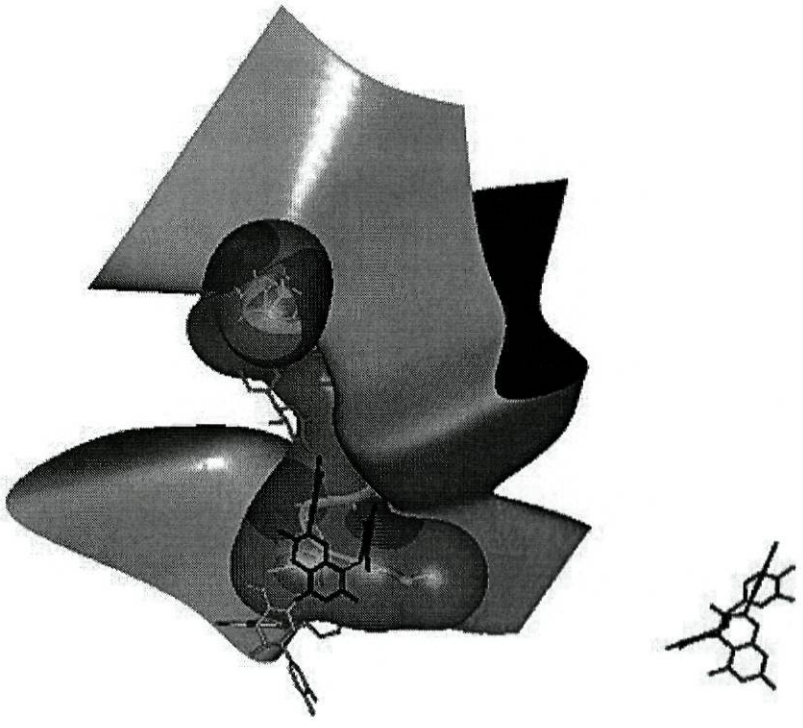


Figura 1-10: Esquema representativo do perfil anfifílico do péptido salivar $IB7_{14}$ na presença do dímero B3 [(-)-catequina-(4α-8)-(-)-catequina]. O perfil da proteína é mostrado como uma fita verde, a parte hidrofílica é mostrada em azul e a parte púrpura representa a zona de interface hidrofílico-lipofílico. A procianidina B3 é mostrada por linhas (Simon *et al.* 2003a).

Pata além da estrutura da proteína, as interacções proteína–tanino são afectadas pela estrutura dos polifenóis e pelas condições do meio em que se encontram (solvente, temperatura, força iónica, etc.) (Oh *et al.* 1980; Artz *et al.* 1987; Hagerman *et al.* 1998).

Hagerman *et al.* (1998) verificaram, medindo a quantidade de proteína e polifenol precipitados, que a ligação de um polifenol a BSA depende do tipo de polifenol envolvido (tanino hidrolisável ou tanino condensado) e propõem inclusive que a polaridade do polifenol pode ser usada para prever se ele vai interagir via ligações hidrofóbicas ou de hidrogénio. Estes autores verificaram que a ligação entre um tanino hidrolisável (PGG) e a BSA é sensível à temperatura e à presença de solventes orgânicos o que indica que a interacção é predominantemente hidrofóbica podendo também ocorrer interacções de hidrogénio. Por sua vez, a procianidina heptadecamérica EC_{16}-C (epicatequina$_{16}$-(4-8)-catequina, uma procianidina polimérica com um peso molecular de 4930, isolada de sorgo) provou ser muito eficaz a precipitar BSA. No entanto, esta interacção não é afectada nem pela presença de metanol, nem pela temperatura o que leva a crer que as interacções em jogo não são predominantemente hidrofóbicas mas hidrofílicas (Hofmann *et al.* 2006).

Artz *et al.* (1987), por seu lado, analisando a termodinâmica da dependência de temperatura da ligação entre procianidinas e proteínas, verificaram que a interacção proteína-polifenol depende do tipo de proteína envolvido. Estes autores verificaram que a ligação de procianidinas (oligómeros) à BSA é hidrofóbica enquanto que a sua ligação a uma globulina de feijão é sobretudo hidrofílica. Os resultados revelaram que as procianidinas oligoméricas são capazes dos dois tipos de interacção. Estes autores verificaram ainda que o tipo de interacção parece depender dos locais disponíveis para a ligação, já que a interacção das procianidinas oligoméricas com a mesma globulina de feijão numa forma desnaturada (expondo outros locais de ligação) passou a ser hidrofóbica.

Parece então que ambos os tipos de interacções podem estar presentes, fortalecendo-se mutuamente e dependendo de diversos factores, entre os quais a estrutura da proteína, do tanino e as condições do meio.

1.3.2 Modelos de interacção propostos para a agregação de complexos proteína-tanino

A capacidade de os polifenóis ligarem a proteínas é acentuada pelo facto de poderem funcionar como ligandos multidentados (Charlton *et al.* 2002b) sendo que um só polifenol pode ligar simultaneamente a mais do que um ponto da cadeia peptídica de uma mesma molécula de proteína ou pode ligar a duas ou mais moléculas diferentes. As proteínas podem enrolar-se à volta do polifenol (Jobstl *et al.* 2006). Por outro lado, os polifenóis têm também a

capacidade de se auto-associar com outros polifenóis, mesmo quando estão ligados a proteínas (Baxter *et al.* 1997).

A complexação entre polifenóis e proteínas pode levar à formação de agregados e eventualmente à precipitação, dependendo das concentrações relativas de proteína e tanino. Foi proposto um modelo em três fases para explicar este fenómeno envolvendo PRPs e taninos (Charlton *et al.* 2002a; Jobstl *et al.* 2004) (Figura 1-11):

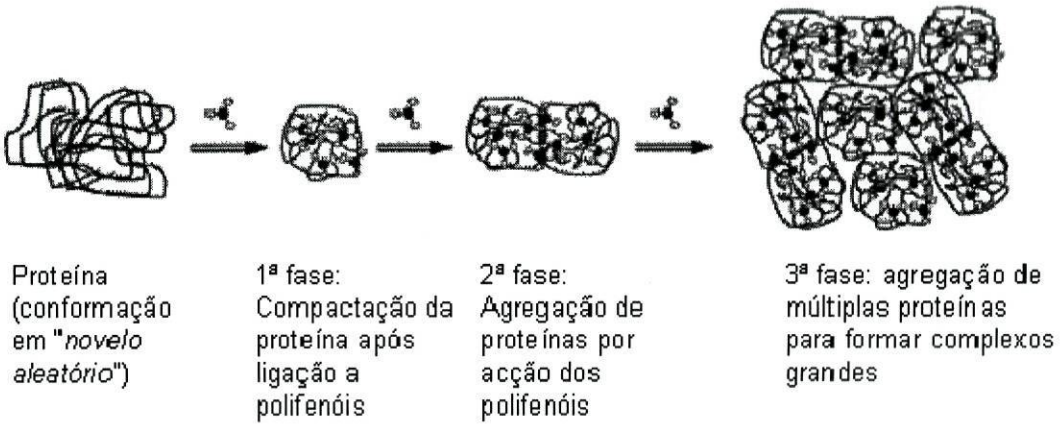


Figura 1-11: Modelo em três fases de ligação entre proteínas (PRPs) e polifenóis, adaptado de Jobstl *et al.* (2004).

As PRPs encontram-se numa conformação em "novelo aleatório" ("random coil") podendo-se ligar aos polifenóis multidentados em mais do que um local. Para baixas concentrações de polifenol, a proteína liga-se em vários locais às moléculas de polifenol, levando a uma contracção da estrutura no complexo formado (1ª fase). Com o aumento da concentração do polifenol, estes ligam-se à superfície da proteína e formam ligações cruzadas com outras proteínas que dimerizam (2ª fase). Para concentrações mais elevadas de polifenol, os dímeros agregam-se e as partículas grandes resultantes precipitam (3ª fase).

Em alguns casos, a formação de agregados insolúveis numa solução de tanino aumenta com o aumento da concentração de proteína, mas, a partir de um certo ponto, na presença de excesso de proteína, ocorre uma diminuição da precipitação, podendo mesmo haver redissolução dos complexos precipitados (Luck *et al.* 1994; Haslam 1998).

Siebert *et al.* (1996) observaram que na presença de gelatina ou gliadina e ácido tânico existe um aumento de turvação com aumento de concentração de proteína até um ponto, a partir do qual um posterior aumento de concentração de proteína levava a um declínio na turvação (Figura 1-12).

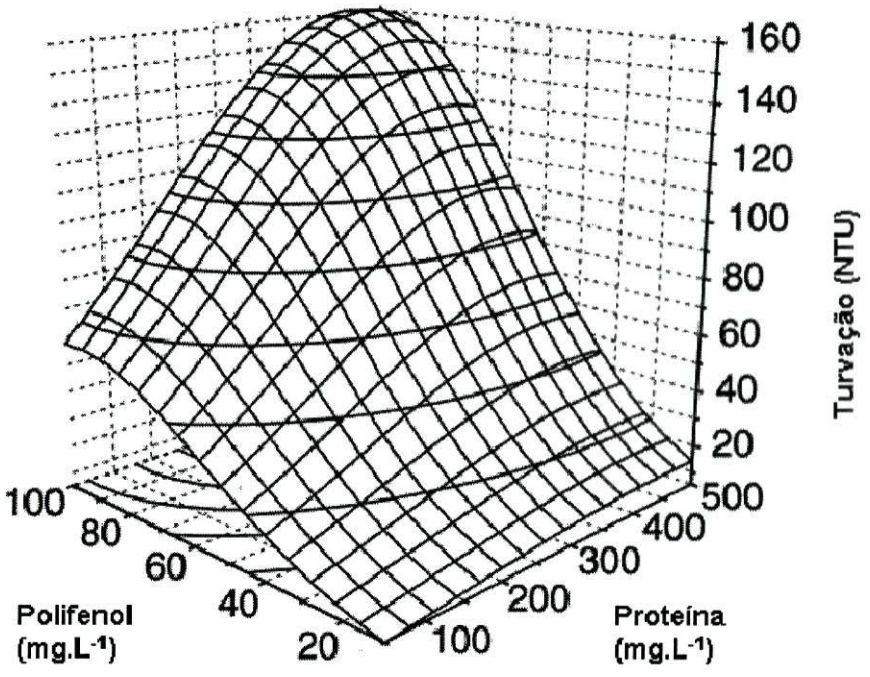


Figura 1-12: Modelo de superfície da formação de turvação com a alteração da concentração de uma proteína (gliadina) e de um polifenol (ácido tânico) no sistema água/etanol a 6% e a pH 3,7 (Siebert 1999).

Siebert *et al.* (1996; 1999) propuseram então um modelo conceptual para explicar este comportamento (Figura 1-13).

Considera-se, por um lado, que as proteínas têm um número limitado de locais aos quais os polifenóis se podem ligar, e, por outro lado, que os polifenóis têm pelo menos dois locais para se poderem ligar às proteínas.

Quando o número de locais de ligação do polifenol é igual ao número de locais de ligação na proteína, forma-se uma "rede" de agregados que origina uma grande intensidade de dispersão de luz.

Para um excesso de proteína relativamente ao polifenol, praticamente todos os polifenóis existentes conseguem unir duas proteínas (ligações cruzadas) formando estruturas "diméricas", mas não iria haver polifenóis suficientes para unir estes "dímeros". Isto resultaria em partículas mais pequenas e numa menor intensidade de dispersão da luz.

Para um excesso de polifenol, a maioria dos locais de ligação duma proteína estariam ocupados por polifenóis, e os complexos impedidos de se ligarem entre si por ligações cruzadas. Esta situação também resultaria em partículas mais pequenas e numa menor dispersão de luz.

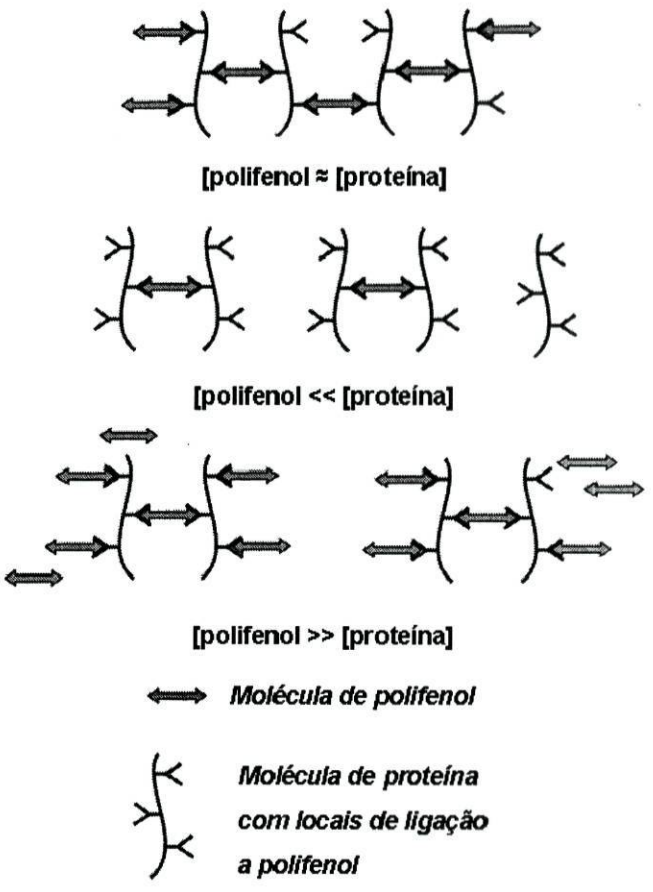


Figura 1-13: Modelo conceptual das interacções proteína-tanino (Siebert *et al.* 1996).

No entanto, a agregação parece depender não só do ratio tanino/proteína, mas também da concentração inicial de proteína. Em estudos com poli-L-prolina e catequina, Poncet-Legrand *et al.* (2006) verificaram que, a um mesmo ratio T/P, a catequina não forma agregados com baixa concentração de proteína (0,03 mM) contrariamente ao que acontece para concentração de proteína elevada (1,06 mM).

1.3.3 Factores que influenciam a interacção entre as proteínas e os polifenóis

Para além das concentrações relativas de proteína/polifenol, estas interacções parecem ser afectadas por diversos outros factores, tais como a estrutura dos polifenóis e das proteínas e condições do meio (pH, força iónica, solvente) que irão ser revistos nesta Secção.

1.3.3.1 Estrutura dos polifenóis

A estrutura dos polifenóis, nomeadamente a estereoquímica, o tipo de ligação interflavânica (C4-C8 e C4-C6), o peso molecular e o grau de galoilação das catequinas, proantocianidinas e

taninos hidrolisáveis foram factores que demonstraram influenciar a sua interacção com diversas proteínas (BSA, α-amilase, histatinas, PRPs, gelatina) (Kawamoto *et al.* 1995, 1996; Baxter *et al.* 1997; Bacon *et al.* 1998; Hagerman *et al.* 1998; de Freitas *et al.* 2001; Wroblewski *et al.* 2001; de Freitas *et al.* 2002; Frazier *et al.* 2003).

A (+)-catequina demonstrou apresentar uma maior actividade tanante especifica (ATE, definida como a capacidade de precipitar proteínas) que a (-)-epicatequina, relativamente a PRPs (Tabela 1-2) (de Freitas *et al.* 2001).

Tabela 1-2: Actividade Tanante Específica (ATE) de procianidinas (0,4 mg) com PRPs salivares humanas (0,132 mg) (em água/etanol 12% a pH 5,0) (de Freitas *et al.* 2001).

	ATE (NTU/mg tanino)
Monómeros	
(+)-catequina	1,45
(-)-epicatequina	0,65
(-)-epicatequina *O*-galhato	2,25
Dímeros	
B2 O-galhato	1,10
B2	0,85
B3	2,75
B4	1,75
B6	2,30
B7	2,10
B8	0,85
Trímeros	
C1	1,05

NTU: Unidades de Turbidez Nefelométrica

Por outro lado, as procianidinas diméricas com ligação interflavânica do tipo C4-C8 (B3 e B4) mostraram uma ATE maior do que os dímeros correspondentes com ligação do tipo C4-C6 (B6 e B8), possivelmente devido às mudanças na conformação impostas pelas ligações C4-C6 (de Freitas *et al.* 2001).

A presença de um grupo galoílo adicional levou a um aumento da interacção com as PRPs. Este fenómeno foi verificado comparando os monómeros (-)-epicatequina com (-)-epicatequina galhato e os dímeros B2 [(-)-epicatequina-(4β-8)-(-)-epicatequina] com B2-3''-O-galhato (de Freitas *et al.* 2001).

A presença de grupos galoílo induz um aumento de locais no polifenol aptos a se ligarem a uma mesma proteína ou proteínas diferentes. No entanto, de Freitas *et al.* (2001) verificaram que o aumento de afinidade com a presença de grupo galoilo foi superior no caso dos monómeros (0,65 e 2,25) do que no caso dos dímeros (0,85 e 1,10) (Tabela 1-2). O facto de a ATE ter apenas um pequeno aumento no dímero B2-3''-O-galhato quando comparado com o dímero não galoilado foi explicado pela estrutura "fechada" que este dímero galoilado apresenta como resultado de uma possível interacção "π–π stacking" entre os anéis benzénicos de galhato e do catecol (Figura 1-14).

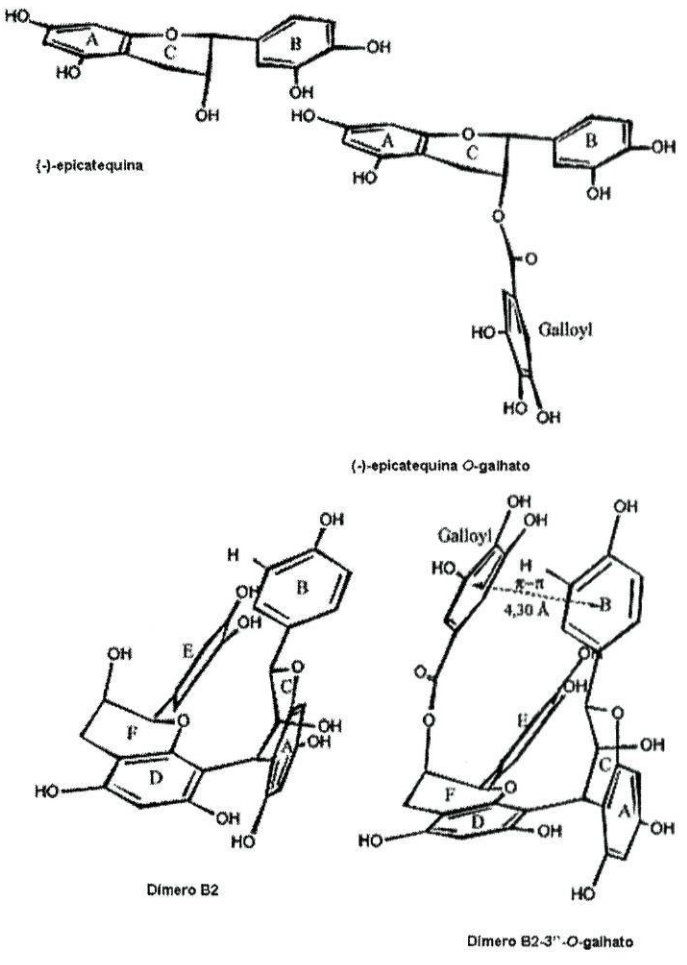


Figura 1-14: conformação preferida por (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-O-galhato, dímero B2 e dímero B2-3''-O-Galhato (de Freitas *et al.* 2001).

Outros autores também verificaram que a presença de um grupo galoílo adicional na posição C3 de catequinas monoméricas, e procianidinas diméricas e triméricas induzia um aumento de interacção com proteínas salivares de parótida (PRPs+α-amilase) e com poli-L-prolina (Ricardo da silva *et al.* 1991; Bacon *et al.* 1998; Poncet-Legrand *et al.* 2006).

O efeito da galoilação também parece afectar a interacção de taninos hidrolisáveis com proteínas. A afinidade de uma série de galoilglucoses para com BSA aumenta pela seguinte ordem: penta>tetra>tri>di>monogaloilglucose. Por outro lado, a posição do grupo galoílo nos taninos hidrolisáveis também afecta esta interacção visto que a afinidade 2,3,6- é superior à da 2,3,4-tri-O-galoilglucose, e a afinidade de 4,6- é superior à de 2,3-di-O-galoilglucose (Kawamoto *et al.* 1995, 1996).

O peso molecular do polifenol também afecta a interacção com as proteínas. Na Tabela 1-2 é possível verificar que a ATE do dímero B3 [(+)-catequina-(4α-8)-(+)-catequina] relativamente a PRPs é praticamente duas vezes maior do que a do monómero (+)-catequina. No entanto, isto não se verificou no caso da (-)-epicatequina, na qual o valor de ATE aumentou apenas ligeiramente com aumento do número de unidades de (-)-epicatequina do monómero, passando pelo dímero (B2) até ao trímero (C1) (de Freitas *et al.* 2001).

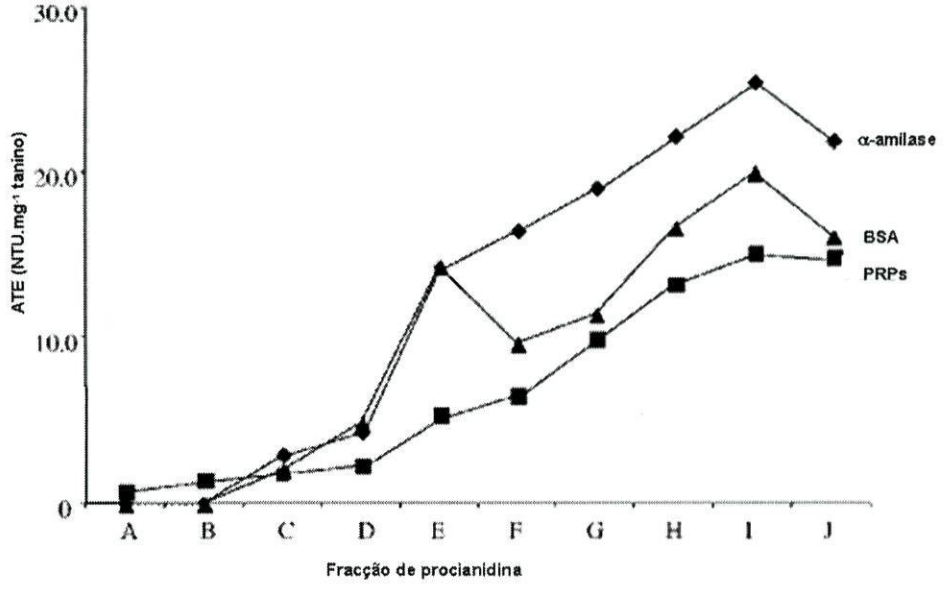
Baxter *et al.* (1997) efectuaram estudos por RMN sobre a interacção de uma série de polifenóis com um fragmento de PRP de 19 resíduos. Estes estudos mostraram que os polifenóis de maior peso molecular e mais complexos interagem mais fortemente com o fragmento de PRP pela seguinte ordem de afinidade de ligação:

dímero B2> PGG> TGG>> (-)-epicatequina ≈ galhato de propilo

Estes autores concluíram que os polifenóis mais pequenos se podem ligar através de um anel fenólico contra cada resíduo de prolina (interacção do tipo "*stacking*"), enquanto que os polifenóis mais complexos formam ligações cruzadas (multidentadas) com os fragmentos de PRP.

Sarni-Manchado *et al.* (1999) verificaram que os taninos condensados com maior grau de polimerização precipitaram predominantemente com as proteínas salivares permanecendo em solução os taninos de menor peso molecular.

Outros estudos mostraram que a ATE das procianidinas aumenta com o aumento do seu grau de polimerização e de galoilação relativamente a diversas proteínas (BSA, PRPs e α-amilase) (Figura 1-15). No entanto, no caso das proteínas globulares (BSA e α-amilase), a afinidade tende a diminuir ligeiramente para procianidinas com pesos moleculares elevados (superiores a 3400 Da), possivelmente devido a impedimentos estereoquímicos que limitam o número de locais de ligação (de Freitas *et al.* 2002).



Fracção	procianidinas (m/z $[M+H]^+$)
A	Monómeros (291)
B	Monómeros (291); monómeros galhato (443)
C	Dímeros (579); trímeros (867)
D	Trímeros (867); dímeros galhato (731); trímeros galhato (1019); tetrameros (1155)
E	Dímeros digalhato (883); trímeros galhato (1019); tetrameros galhato (1307); pentameros (1443)
F	Tetrameros galhato (1307); tetrameros digalhato (1459); pentameros galhato (1595); pentameros digalhato (1747)
G	Tetrameros tetragalhato (1763); hexameros galhato (1883); heptameros (2019)
H	Heptameros galhato (2171); hexameros digalhato (2035)
I	$3000 < M_r < 3500$
J	$3500 < M_r < 4000$

Figura 1-15: influência do grau de polimerização das procianidinas na sua capacidade de complexar com PRPs (48 μg), α-amilase (132 μg) e BSA (60 μg), num sistema de água/etanol 12% e a pH 5,0 (de Freitas *et al.* 2002).

Segundo alguns autores, os taninos hidrolisáveis interagem com as proteínas de um modo diferente dos taninos condensados (Hagerman *et al.* 1998; Wroblewski *et al.* 2001; Frazier *et al.* 2003).

De facto, tal como foi referido anteriormente (Secção 1.3.1), os taninos hidrolisáveis parecem ter uma natureza hidrofóbica e interagir com as proteínas de um modo distinto ao dos taninos condensados (Hagerman *et al.* 1998). De facto, Hagerman *et al.* (1998) estudaram a interacção entre BSA e uma procianidina heptadecamérica (EC_{16}-C) e um tanino hidrolisável (PGG). Verificou-se que EC_{16}-C é mais eficiente na complexação com a BSA do que a PGG.

Num outro estudo Wroblewski *et al.* (2001) verificaram que a um ratio de Histatina:PGG de 1:1 se formam complexos solúveis de pequena dimensão, no entanto, com o aumento da concentração de PGG, os complexos formados tornam-se insolúveis. No caso da EGCG, formam-se complexos de histatina-EGCG solúveis que podem conter até 7 moléculas de EGCG por molécula de histatina.

Frazier *et al.* (2003) estudaram a interacção entre taninos de tara (taninos gálhicos) e de taninos de mirabolanos (taninos gálhicos e elágicos) com as proteínas BSA e gelatina. Estes

autores verificaram que os taninos com maior flexibilidade conformacional (taninos gálhicos de tara com cadeias de ácido gálhico flexíveis) apresentam mais afinidade e interacções mais fortes, talvez por serem melhores ligandos multidentados podendo estabelecer mais facilmente ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas, fortalecendo os complexos.

1.3.3.2 Estrutura das proteínas

Outro factor que influencia a interacção proteína-tanino é a estrutura das proteínas. Hagerman e Butler (1981) fizeram estudos de competição entre taninos condensados (de sorgo) e diversas proteínas. Os autores mediram a percentagem de uma proteína marcada (BSA marcada radioactivamente) que foi precipitada na presença e na ausência de uma outra proteína (competidora). A afinidade foi definida como quantidade de proteína (competidora) necessária para causar 50% de inibição na precipitação de BSA marcada. Foram estudadas cerca de 20 proteínas e verificou-se que existem grandes diferenças de afinidades entre estas proteínas. Estas diferenças sugerem que as proantocianidinas interagem com as proteínas de uma maneira específica e selectiva. Na presença de duas proteínas (BSA marcada e proteína competidora), as proantocianidinas conseguem interagir apenas com uma das proteínas (competidora) e formar agregados insolúveis, mesmo na presença de excesso de outra proteína (BSA), o que indica a especificidade da interacção. Esta interacção parece ser influenciada por vários factores, tais como a composição em aminoácidos, a sequência de aminoácidos, o tamanho, a conformação e a carga da proteína.

Uma característica comum às proteínas e polipéptidos com maiores afinidades para com taninos parece ser a sua composição em prolina. No entanto, a afinidade das proteínas não é intrínseca aos anéis heterocíclicos de prolina ou outros, já que o aminoácido prolina e os seus derivados apresentam afinidades por taninos semelhantes à mostrada por outros aminoácidos acíclicos como a glicina ou a alanina (Hagerman *et al.* 1981). Baxter *et al.* (1997) sugerem que os resíduos de prolina, para além de servirem como local de ligação, são resíduos que ajudam a manter o péptido numa conformação aberta e por isso com uma maior exposição de locais de ligação aos taninos comparativamente a proteínas com uma estrutura mais compacta e globular.

De facto, Hagerman et al (1981) verificaram que a afinidade de ribonuclease A tratada quimicamente de modo a adoptar uma estrutura em "novelo aleatório" tem uma afinidade para com taninos duas vezes superior à da mesma proteína na sua conformação nativa (compacta). O mesmo se verifica com α–lactalbumina que tem uma afinidade 8 vezes superior à de lisozima que tem uma sequência de aminoácidos similar mas uma estrutura mais compacta.

A interacção proteína-tanino depende também da estrutura primária, i.e., da sequência de aminoácidos da proteína. Wroblewski *et al.* (2001), verificaram por RMN que a ligação de polifenóis a histatinas modificadas (com a mesma composição em aminoácidos mas em que estes foram dispostos de modo aleatório na cadeia peptídica) foi significativamente diminuída.

A presença de cadeias laterais de carboidrato nas proteínas também podem inibir a sua ligação a taninos. Estudos mostraram que a deglicosilação de uma PRP glicosilada levou a um grande aumento da capacidade de se ligar a taninos (Lu *et al.* 1998).

Maury *et al.* (2003) sugerem que a composição das proteínas em aminoácidos parece não ser tão importante como o tamanho da proteína, já que glútens hidrolisados e não hidrolisados têm a mesma composição em aminoácidos mas os hidrolisados, com menor peso molecular precipitam mais polifenóis. Hagerman *et al.* (1981), por seu lado, verificaram que as afinidades relativas de diversas poliprolinas aumentam com o aumento de peso molecular.

Frazier *et al.* (2003) estudaram as interacções entre taninos gálhicos (de mirabolanos) e as proteínas BSA e gelatina por microcalorimetria e titulação isotérmica. Estes autores verificaram que, no caso da BSA, a interacção com taninos não é especifica, isto é, não se ligam a locais próprios na proteína, dado que as isotérmicas de ligação mostram um decréscimo gradual de exotermicidade à medida que o tanino é adicionado à solução de BSA e não apresentam a forma sigmoidal característica das ligações específicas ligando-proteína. Por outro lado verificaram que a cada molécula de BSA se liga um grande número de taninos que se liga (48-178) o que apoia a hipótese de esta interacção não ser específica. Os estudos destes autores com gelatina mostram um comportamento diferente do da BSA, havendo pelo menos duas fases de interacção:

- Numa primeira fase parece haver uma sinergia na ligação do tanino gálhico à proteína em que os taninos que já estão ligados à proteína têm efeito na formação de novas ligações de interacção. Nesta primeira fase, as interacções tanino-gelatina, ao contrário da BSA, parecem ocorrer em locais específicos da proteína.
- Na segunda fase há uma diminuição de exotermicidade a cada injecção de tanino, duma maneira muito semelhante à que ocorreu na BSA, o que leva a crer que nesta segunda fase existe ligação menos específica e ocorrem fenómenos de agregação.

Estas diferenças entre as duas proteínas parecem indicar que o mecanismo de ligação é determinado pela natureza da proteína.

1.3.3.3 pH do meio

Outro factor que influencia a interacção proteína-tanino é o pH. Aparentemente existe uma maior precipitação de proteínas a valores de pH próximos do seu ponto isoeléctrico (pI) (Naczk *et al.* 1996; Kawamoto *et al.* 1997b; Hagerman *et al.* 1998). Estudos anteriores (Hagerman *et al.* 1981) sugerem que as interacções proteína-tanino são maiores a pH perto do pI, em que as repulsões electrostáticas proteína-proteína estão minimizadas. Assim, as proteínas com pHs mais acídicos revelam maiores afinidades a pH baixo e proteínas básicas a pH superior, o que também foi confirmado por Yan *et al.* (1995).

No entanto, Charlton *et al.* (2002a) estudaram a interacção entre EGCG e uma PRP básica de 19 resíduos e verificaram que, apesar de existir claramente uma menor precipitação a valores de pH inferiores, as afinidades da ligação (calculadas por RMN através dos desvios químicos dos protões dos péptidos) não parecem ser afectadas pelo pH (para valores entre 3,8 e 6). Estes autores sugerem que os fenómenos *ligação* ("binding") e *precipitação* estão relacionados mas não são idênticos. Os agregados estão num estado coloidal, em que as partículas pequenas estão estabilizadas por repulsão de carga entre partículas, e a precipitação dos complexos pode ser um processo de separação de fases, em que diversas destas partículas pequenas se agregam e os complexos de proteína-polifenol deixam de ser miscíveis com o solvente. O tanino utilizado neste estudo (Charlton *et al.* 2002a), a EGCG, tem um pKa de cerca de 9, sugerindo que é improvável que a dependência da agregação a pHs na gama entre 3,8-6 seja devida ao polifenol, e que é mais provável que se deva ao grupo C-terminal carboxilíco do peptido, com um pKa de 3,1. As cadeias laterais de arginina presentes no péptido (uma PRP básica de 19 aminoácidos) vão fazer com que o péptido seja carregado positivamente na gama de pHs estudados. No entanto, ao pH mais alto (pH = 6), a carga total será menor. Isto faz com que um agregado de várias centenas de moléculas de péptido seja mais estável quando a carga é menor, o que pode explicar a maior precipitação observada pelos autores a valores de pH mais elevados. Charlton *et al.* (2002a) sugerem ainda que a ligação inicial do polifenol ao péptido parece ser essencialmente uma interacção hidrofóbica, mas o tamanho dos complexos proteína-polifenol insolúveis vai ser provavelmente determinado por efeitos de carga superficial.

1.3.3.4 Força iónica

As interacções proteína-tanino também parecem ser afectadas pela força iónica.

Oh *et al.* (1980) verificaram que a interacção de uma mistura de taninos condensados com as proteínas gelatina e poli-prolina aumenta com o aumento da força iónica (0,01, 0,1 e 1 M). Os autores indicam que uma característica das interacções hidrofóbicas é o aumento da força de interacção com o aumento de força iónica, e sugerem que a interacção entre estas proteínas (gelatina e poli-prolina) e os taninos condensados é hidrofóbica. Este efeito não foi verificado com os mesmos taninos condensados e a BSA, em que a força iónica não afectou a formação de complexos.

Luck *et al.* (1994), num estudo com um tanino hidrolisável (PGG) e diversas proteínas, verificaram que na presença de NaCl 1 M existe um aumento de precipitação na generalidade dos sistemas de proteínas-PGG estudados (Tabela 1-3): verificaram um aumento da precipitação máxima e uma diminuição da concentração de proteína necessária para atingir esta precipitação máxima. Estes autores sugerem que este aumento de precipitação se deve a um aumento das interacções hidrofóbicas na presença do sal e a uma diminuição da solubilidade da proteína.

Tabela 1-3: Valores de precipitação máxima e de concentração de proteína necessária para atingir a precipitação máxima, num sistema de PGG-proteína, na ausência e na presença de NaCl. Adaptado de Luck *et al.* (1994).

Proteína	*Sem NaCl*		*NaCl 1,0 M*	
	Precipitação Max (%)	[Proteína] (μM)	Precipitação Max (%)	[Proteína] (μM)
Polivinilpirrolidona[a]	24	2,5	97	1,6
Caseínato de sódio	18	1,3	75	0,9
Ribonuclease	9	2,0	10	2,3
β-lactoglobulina	0	-	65	5,5
BSA	0	-	17	0,5

a: a polivinilpirrolidona não é uma proteína, mas sim um polímero

Outros autores verificaram que o efeito da força iónica parece depender da sua gama de valores. Kawamoto e Nakatsubo (1997b) observaram uma diminuição de precipitação de complexos BSA-PGG com aumento de concentração de NaCl de 5 a 100 mM mas um aumento drástico de precipitação com aumento de força iónica de 100 mM a 1 M. Estes autores sugerem que o aumento da precipitação para elevadas forças iónicas está relacionado com a solubilidade da proteína: factores que baixam solubilidade da proteína (como o I elevado) levam a uma diminuição da solubilidade dos complexos.

Siebert *et al.* (1996) verificaram que adicionando NaCl a uma mistura turva de catequina e gliadina (em que já tinha ocorrido a formação de complexos), ocorre um aumento de turvação, provavelmente devido ao fenómeno "salting out" da proteína.

Rawel *et al.* (2005), através de medições de fluorescência da quercetina, verificaram que o aumento de força iónica diminui a interacção entre quercetina e BSA. Estes autores sugerem que o aumento da força iónica leva a uma diminuição das interacções electrostáticas e a um aumento da camada de hidratação da proteína o que pode contribuir para prevenir interacções proteína-polifenol. Os autores verificaram ainda a existência de uma afinidade residual BSA-quercetina mesmo a forças iónicas elevadas e sugerem que a estrutura da BSA se altera com o aumento da força iónica expondo resíduos hidrofóbicos que assim podem formar ligações hidrofóbicas. Apesar do aumento da força iónica dificultar a obtenção de espectros de dicroismo circular, os resultados destes autores mostraram que a molécula de BSA tende a desdobrar-se com o aumento da força iónica e que este desdobramento leva a uma diminuição da ligação de BSA-quercetina.

No conjunto dos resultados descritos parece que, no geral, a força iónica induz um aumento da agregação de complexos proteína-polifenol e um aumento da precipitação. No entanto, e nomeadamente no caso da BSA, parecem ocorrer resultados contraditórios: Rawel *et al.* (2005) observaram uma diminuição da afinidade com aumento da força iónica e Oh *et al.* (1980) não observaram qualquer efeito.

Tal como foi salientado por Kawamoto *et al.* (1997b) a interacção BSA-polifenol parece depender da gama de valores da força iónica, e é possível que dependa simultaneamente dos valores de pH e da natureza do polifenol, que foram diferentes em cada um dos casos referidos anteriormente (Rawel, pH 7 e quercetina; Oh, pH 4 e taninos condensados; Luck, pH 5 e PGG).

1.3.3.5 Outros factores

As interacções proteína-tanino parecem também ser afectadas por outros factores. A presença de etanol parece induzir uma diminuição da precipitação de taninos do vinho por acção de BSA (Serafini *et al.* 1997). Hagerman *et al.* (1998) verificaram que por um lado, o metanol diminui a precipitação de PGG-BSA e por outro lado não afecta a precipitação de $EC_{16}C$-BSA.

A temperatura parece também afectar estas interacções de um modo diferente para taninos condensados e taninos hidrolisáveis. A interacção de BSA com taninos hidrolisáveis parece aumentar com a temperatura (Kawamoto *et al.* 1997b; Hagerman *et al.* 1998), o mesmo

acontecendo na interacção de gelatina e poliprolina com taninos condensados (Oh *et al.* 1980). A interacção de BSA com taninos condensados não parece ser influenciada pela temperatura (Oh *et al.* 1980; Hagerman *et al.* 1998).

A presença de açúcares em solução parece levar a uma diminuição da interacção proteína-tanino (Luck *et al.* 1994), mas este factor será discutido posteriormente.

1.4 A adstringência

A adstringência é uma sensação que pode ser sentida numa grande variedade de alimentos incluindo frutos, chocolate, chá, vinho e cerveja. É normalmente descrita como um conjunto de múltiplas percepções com várias sensações bucais tais como aspereza e secura (falta de lubrificação ou humidade que provocam um atrito ou fricção entre as várias superfícies orais) e de constrição (a sensação de aperto e contracção dos tecidos sentida na boca, lábios e interior das bochechas), resultante da exposição a certas substâncias como os taninos (Lee *et al.* 1991; Lawless *et al.* 1994; Gawel *et al.* 2001). Para além dos taninos, outros compostos adstringentes incluem sais de alumínio, ácidos e agentes desidratantes tais como o etanol (Lawless *et al.* 1994).

Esta sensação prolonga-se no tempo e tem a tendência de se tornar mais pronunciada com a exposição continuada a este tipo de compostos durante a ingestão (tal como acontece quando se bebem vários goles de vinho) (Clifford 1997).

A adstringência é frequentemente percepcionada como um atributo negativo dos alimentos o que leva os consumidores por vezes a rejeitarem estes produtos. No caso dos frutos, a adstringência deve-se sobretudo ao facto de não estarem suficientemente amadurecidos. No entanto, parece que existe uma habituação do consumidor à adstringência em que se acaba por "aprender a gostar" de produtos com esta característica sensorial. Por outro lado, alimentos considerados potencialmente adstringentes como chás, vinhos tintos, cervejas, têm associados uma cultura social (e de confraternização) que contribui para o consumidor apreciar estes alimentos mesmo sendo adstringentes. Um caso evidente é o do vinho em que as pessoas conhecedoras tendem a classificar o vinho adstringente usando descritores como "com carácter" e "bom final de boca", que não são propriamente depreciativos (Lesschaeve *et al.* 2005).

De facto, a sensação de adstringência é um dos atributos sensoriais mais importantes em vinhos tintos. Os vinhos tintos de elevada qualidade tendem a ter níveis equilibrados de adstringência: não são excessivamente adstringentes, o que poderia mascarar outras qualidades dos vinhos e torná-los, na gíria do enólogo "ásperos" e "secos", nem têm um nível muito baixo de adstringência que os torne em vinhos "planos", "insípidos" e "desinteressantes" (Gawel 1998). Recentemente foi desenvolvido um vocabulário de sensações provocadas por vinhos tintos na boca dos provadores, entre as quais grande parte é referente à adstringência, como se pode ver na Figura 1-16 (Gawel *et al.* 2000).

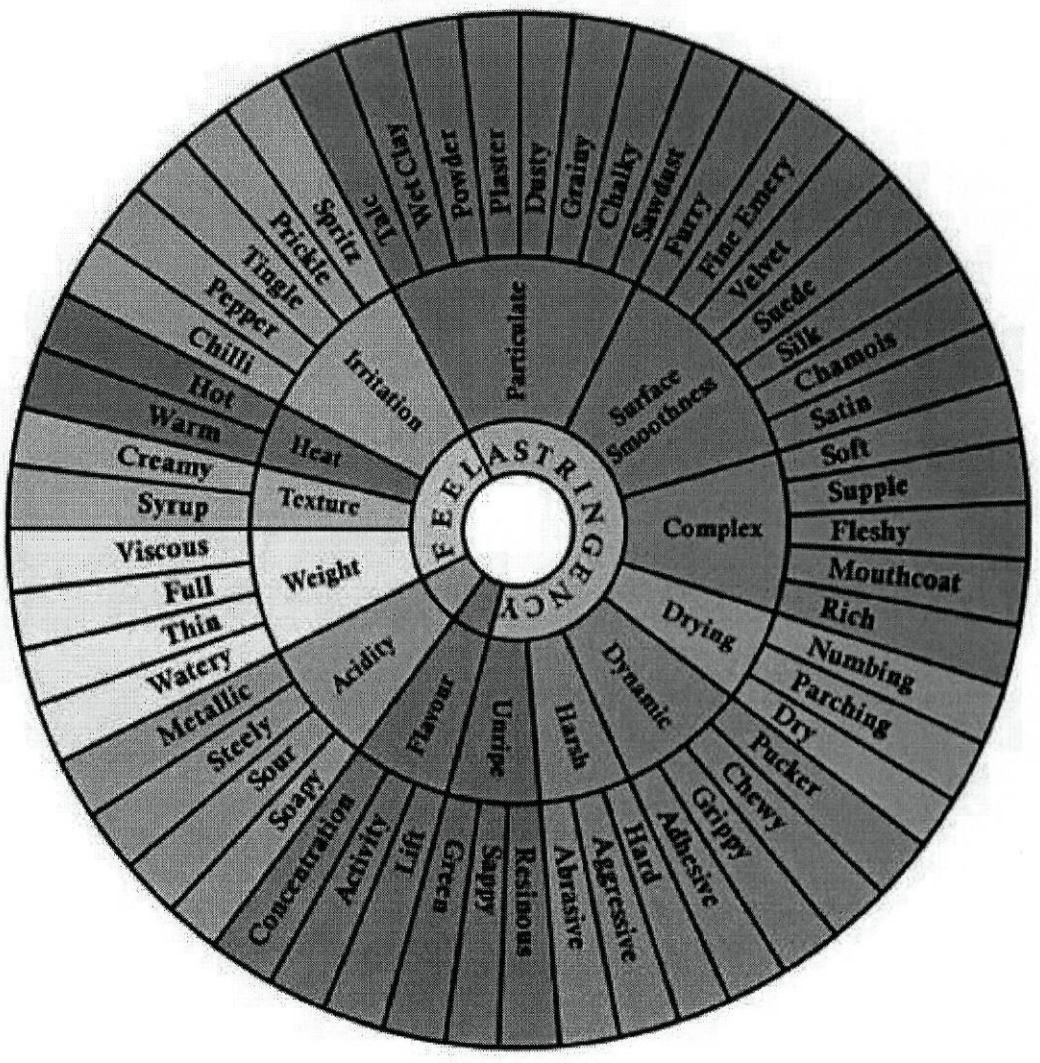


Figura 1-16: Roda da "prova de boca" ("Mouth-Feel Wheel") mostrando uma representação hierárquica de termos que podem ser usados para descrever características sensoriais dos vinhos tintos (Gawel *et al.* 2000).

1.4.1 Mecanismo da adstringência

Existe alguma controvérsia sobre se a adstringência é um sabor, tal como o doce, o amargo, o salgado, o ácido e o umami, sendo o sinal de adstringência transmitido pelo nervo "corda do tímpano", ou se será uma sensação táctil provocada por um aumento de fricção ou uma diminuição de lubrificação da língua e do palato transmitido pelo nervo trigeminal (Clifford 1997). No entanto, esta segunda hipótese é a mais aceite pela comunidade científica.

Os mecanismos propostos para a sensação de adstringência podem ser divididos em "gustativos" e aqueles que se baseiam na "fricção".

A hipótese de que a adstringência é um sabor foi estudada por Critchley e Rolls (1996), que mostraram que existe actividade neuronal associada ao gosto em resposta ao estímulo causado

pelo ácido tânico. No entanto, este composto também tem um gosto ácido e amargo, pelo que a actividade neuronal poderia ter sido causada por estes gostos secundários.

Uma evidência que contraria a hipótese do sabor é o facto de a intensidade da adstringência acumular quando se provam várias amostras, e também quando se prova muitas vezes uma mesma amostra (Figura 1-17), enquanto que o que acontece com os outros sabores é uma adaptação que leva a uma diminuição da intensidade percebida com a ingestão continuada duma amostra (Lesschaeve *et al.* 2005). Um aspecto a favor da adstringência ser uma sensação táctil é o de poder ser sentida em locais da boca em que não existem receptores gustativos. De facto, passando uma solução adstringente (alúmen) no interior do lábio superior é possível percepcionar a adstringência (Breslin *et al.* 1993).

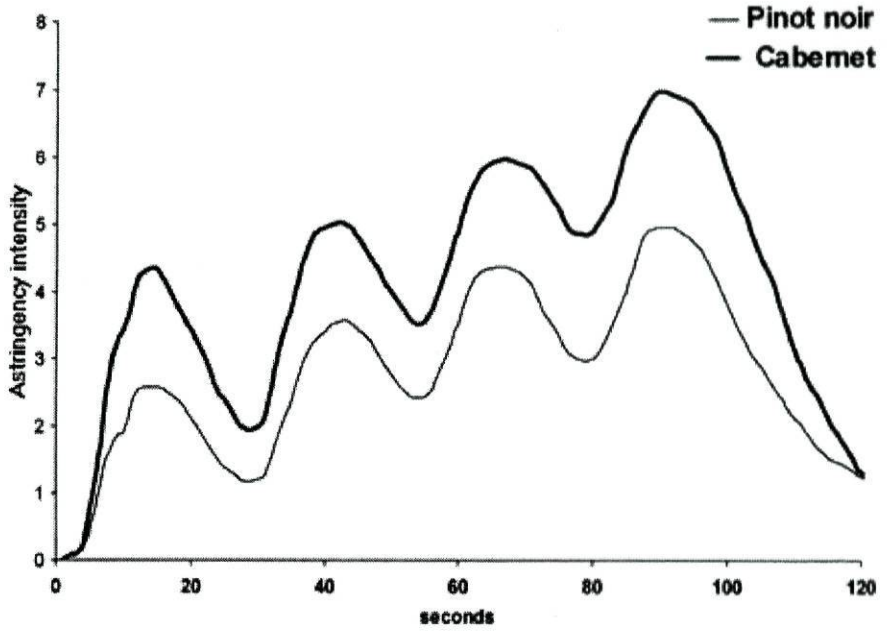


Figura 1-17: Curvas médias de Tempo-Intensidade para a adstringência de dois vinhos tintos (10 ml de vinho provados a intervalos de 25 segundos) evidenciando o efeito acumulativo desta sensação (Lesschaeve *et al.* 2005).

Os defensores da adstringência como uma sensação táctil descrevem esta sensação como resultante da precipitação de mucoproteínas salivares (Green 1993).

A precipitação de proteínas salivares foi verificada por Kallithraka *et al.* (1998). Estes autores verificaram que há uma perda de proteína salivares após a prova de soluções adstringentes (contendo taninos). Esta perda foi atribuída a uma precipitação das proteínas após complexação com polifenóis, o que fornece provas que corroboram o mecanismo táctil da adstringência.

Monteleone *et al.* (2004), usando um painel de provadores (30 indivíduos) avaliaram a adstringência de várias soluções com diferentes concentrações de acido tânico e extracto de

grainha de uva. A estas soluções foram adicionadas uma solução de proteína (mucina) em condições semelhantes às que se encontram na cavidade oral, e foi medida a turvação causada pela formação dos agregados proteína-tanino por nefelometria. Os autores verificaram uma relação linear entre a turvação da solução e a adstringência sentida por indivíduos, tal como pode ser observado na Figura 1-18 A.

Num outro estudo (Condelli *et al.* 2005), o mesmo grupo verificou que a relação linear entre turvação e adstringência também se verifica com vinhos (Figura 1-18 B).

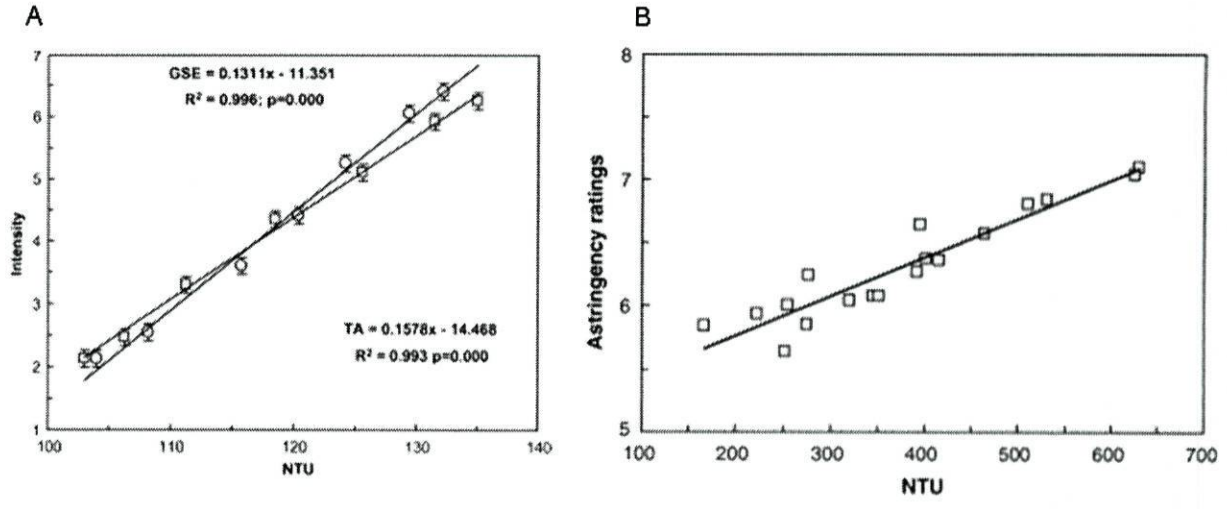


Figura 1-18: Relação entre a adstringência sensorial de soluções contendo polifenóis e valores de NTU medidos em misturas dos mesmos polifenóis e mucina. A: ○, ácido tânico (TA) e □, Extracto de grainha de uva (GSE) (Monteleone *et al.* 2004); B: □ amostras de vinhos (Condelli *et al.* 2005).

Esta correlação entre a capacidade de uma amostra de tanino provocar a precipitação de proteínas e causar a sensação de adstringência também foi verificada outros autores (Llaudy *et al.* 2004; Gambuti *et al.* 2006; Troszynska *et al.* 2006).

A interacção de proteínas salivares com taninos foi observada por diversos outros autores, o que irá ser discutido nos capítulos seguintes.

Existem dois mecanismos possíveis pelos quais a precipitação de proteínas pode afectar a fricção e consequentemente estar na origem da sensação de adstringência (De Wijk *et al.* 2006):

1) As propriedades lubrificantes da saliva são reduzidas possivelmente como resultado da perda de proteínas salivares, diminuindo a viscosidade.
2) O precipitado formado é sentido como uma partícula que aumenta a fricção entre as superfícies em contacto na boca

Prinz e Lucas (2000) verificaram que o ácido tânico tem a capacidade de diminuir a viscosidade da saliva e aumentar a fricção. Estes autores atribuíram este fenómeno à precipitação de PRPs salivares, e especularam que o mecanismo pelo qual o ácido tânico afecta a adstringência é devido ao facto de a saliva, após a perda das proteínas, se tornar mais fluida e perder as suas capacidades lubrificantes.

No entanto, mais recentemente De Wijk e Prinz (2006) concluíram que a viscosidade da saliva não está relacionada com as suas propriedades lubrificantes, em alternativa descreveram um mecanismo em que a sensação de aspereza é causada pela presença de partículas em solução e não pela perda da viscosidade salivar.

A formação de partículas pode ser devida não só à precipitação de proteínas pelos polifenóis, mas também à agregação de partículas suspensas na saliva, tais como células epiteliais e detritos variados. Os compostos adstringentes poderiam também afectar directamente as propriedades da mucosa oral através da desnaturação de proteínas da superfície do epitélio (De Wijk *et al.* 2006).

1.4.2 Proteínas salivares

A saliva é produzida por três pares de glândulas salivares maioritárias: parótida, submandibular e sublingual, e por algumas glândulas minoritárias (Figura 1-19). As glândulas maioritárias produzem cerca de 90% da saliva total. A saliva é composta por cerca de 99% de água e 1% de sólidos, na sua maioria proteínas e sais.

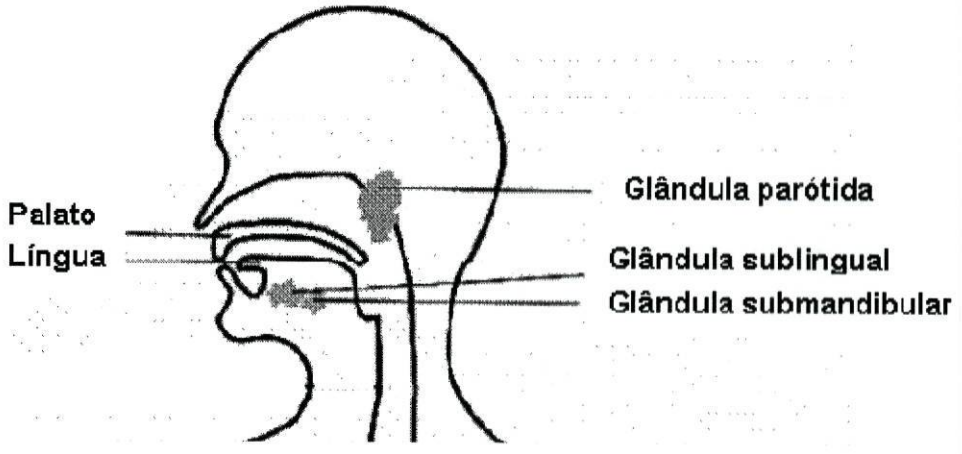


Figura 1-19: Esquema representativo da localização das glândulas salivares maioritárias (Pedersen *et al.* 2002).

As glândulas da parótida produzem um fluido aquoso quando são estimuladas (por uma refeição, por exemplo) que corresponde a cerca de metade do fluido presente na boca em

condições estimuladas. Em condições não estimuladas a maioria da saliva é produzida pelas glândulas submandibulares, que produzem uma saliva muito mais viscosa (Pedersen *et al.* 2002).

A saliva submandibular/sublingual é composta em grade parte por mucinas, contendo também α-amilase, cistatina, lisozima e PRPs acídicas (Veerman *et al.* 1996; Walz *et al.* 2006). As mucinas são proteínas grandes com um nível elevado de glicosilação e um grande potencial de hidratação, que permitem prevenir a secura, e com propriedades viscoelásticas que proporcionam lubrificação (Dodds *et al.* 2005).

As histatinas encontram-se tanto na saliva de parótida como na saliva submandibular/sublingual e representam 2,6% da proteína.

No que se refere à saliva de parótida, cerca de 30% é constituído por α-amilase e contêm também quantidades minoritárias de outras proteínas tais como lisozima, lactoferrina, etc. Os restantes 70% são constituídos por proteínas que contêm elevados níveis de prolina (35-40%) e são por isso chamadas de proteínas ricas em prolina ou PRPs.

As PRPs podem ser divididas em três grandes grupos com base na carga e no grau de glicosilação: PRPs básicas, PRPs acídicas e PRPs glicosiladas, constituindo respectivamente cerca de 23%, 30%, e 17% do teor total de proteínas da saliva de parótida (Kauffman *et al.* 1979).

As PRPs acídicas têm diversas funções descritas. Têm a capacidade de se ligar à superfície dos dentes, participando na formação de uma película complexa com diversas moléculas adsorvidas (película adquirida de esmalte) e têm a capacidade de se ligarem ao cálcio, parecendo actuar como reservatórios de cálcio para a remineralização. Também parecem inibir a precipitação de fosfato de cálcio, mantendo a saliva supersaturada neste mineral. As PRPs glicosiladas, por seu lado, ligam-se a bactérias orais, aglutinando-as, e parecem ter funções lubrificantes (Bennick 2002; Dodds *et al.* 2005).

Ainda não se sabe exactamente a função das PRPs básicas, no entanto pensa-se que o seu papel poderá estar relacionado com a sua ligação aos taninos. Recentemente uma PRP básica não identificada mostrou inibir a infectividade do vírus HIV-1 (Robinovitch *et al.* 2001).

1.4.2.1 PRPs básicas

Existem diversas PRPs básicas na saliva da parótida, embora estas também possam ser encontradas no tracto respiratório (Sabatini *et al.* 1989). Onze destas proteínas foram descritas na saliva da parótida de um único indivíduo (Kauffman *et al.* 1991): as proteínas IB1-IB7,

IB8a, IB8b, IB8c e IB9. Uma destas PRPs básicas, IB8b, também pode ser encontrada na saliva submandibular/sublingual (Robinson *et al.* 1989). Estas proteínas têm entre 38 e 118 resíduos de aminoácidos (Figura 1-20), todas contêm segmentos com sequências de aminoácidos idênticas ou muito similares, exibindo uma elevada homologia nas suas sequências e parecem resultar da degradação proteolítica de produtos genéticos iniciais. Existem outras duas PRPs básicas de parótida, que não foram identificadas na saliva de Kauffman (1991). Estas proteínas denominam-se Ps1 e Ps2, e contém 240 e 301 aminoácidos, respectivamente (Azen 1993; Azen *et al.* 1993).

Todas estas proteínas exibem regiões de estrutura comum e regiões com diferenças individuais (Figura 1-20A).

Tome-se como exemplo a sequência de aminoácidos do péptido IB8c (Figura 1-20 B). Pode-se observar que num péptido de 61 aminoácidos, 25 são resíduos de prolina, que ocorrem individualmente e em séries de di-, tri, tetra- e pentaprolilos. A sequência hexapeptídica PQGPPP ocorre 5 vezes neste péptido. O péptido IB8c contém dois segmentos de 21 aminoácidos contíguos com sequências praticamente idênticas, seguidas de uma sequência de 12 aminoácidos que também se repete. Este padrão repetitivo exibido nos resíduos 1-54 é recorrente em outras PRPs básicas da saliva humana, nomeadamente nas proteínas IB7 e IB9, que são as mais semelhantes (Figura 1-20 A) (Kauffman *et al.* 1991).

Relativamente às suas estruturas, Murray *et al.* (1994a) realizaram estudos que parecem indicar que péptidos derivados de PRPs básicas de rato adoptam uma estrutura em novelo aleatório, sem ligações hidrogénio intramoleculares. Simon *et al.* (2003b) por seu lado, usando uma PRP humana sintetizada (IB7), mostraram que nem toda a estrutura é aleatória e que pelo menos um terço dos aminoácidos da proteína IB7 se encontra na conformação de hélice secundária do tipo II (uma conformação semelhante a hélice de colagénio típica de proteínas ricas em prolina).

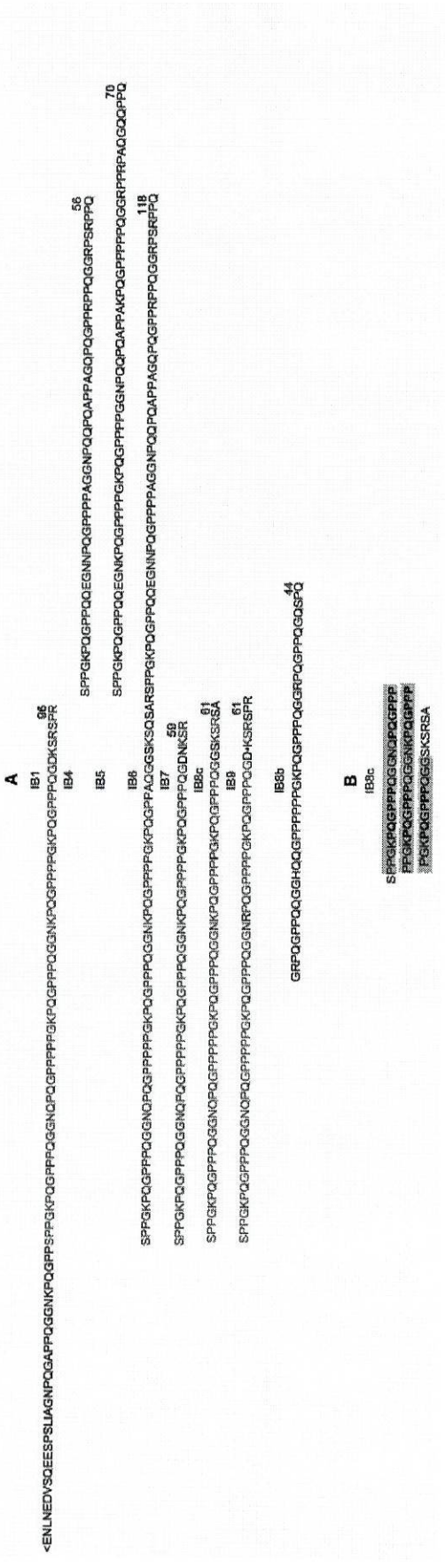


Figura 1-20: Comparação das sequências de aminoácidos de diversas proteínas ricas em prolina isoladas da saliva da parótida. A) PRPs básicas alinhadas de modo a evidenciar as homologias entre diversas proteínas (de salientar as semelhanças em tamanho e sequência das proteínas IB7, IB8c e IB9). B)

Sequência de aminoácidos completa da PRP salivar IB8c alinhada de modo a evidenciar os motivos recorrentes (Kauffman *et al.* 1991). O símbolo < indica um resíduo N-terminal bloqueado.

A produção de PRPs básicas parece ser um fenómeno variável de pessoa para pessoa. Num estudo recente verificou-se que de entre 13 indivíduos nem todos produziam as mesmas PRPs básicas, sendo que, por exemplo, a proteína IB9 foi detectada em apenas dois destes adultos, a IB8c em 9 destes adultos e, neste estudo não foi detectada qualquer IB7 (Messana *et al.* 2004). Tal como referido no ponto anterior, ainda não se sabe exactamente a função das PRPs básicas, apesar de estas serem amplamente investigadas, pelo que não se pode ainda fornecer uma explicação para a sua abundância e heterogeneidade molecular e inter-individual. A ser confirmado o seu papel na inibição da infectividade do vírus HIV-1 (Robinovitch *et al.* 2001), esta actividade anti-viral poderia fornecer uma razão para a sua abundância na saliva (Messana *et al.* 2004).

1.4.3 Interacções entre taninos e proteínas salivares

Uma indicação de que a adstringência deve estar relacionada com a formação de agregados de polifenóis e proteínas salivares é o facto da adstringência sentida na prova de soluções ricas em taninos estar directamente relacionada com a capacidade destes mesmos taninos precipitarem com proteínas, tal como foi referido anteriormente (Secção 1.4.1).

A interacção entre tanino e proteínas de saliva humana leva à precipitação de diferentes quantidades de praticamente todas as proteínas presentes na saliva (Gambuti *et al.* 2006). No caso da mucina e de algumas PRP básicas essa precipitação é praticamente total mesmo para concentrações baixas de tanino (extractos de grainha de uva e ácido tânico). No entanto, outras proteínas, tais como as PRPs glicosiladas e a α-amilase, precipitam progressivamente com aumento de concentração de tanino, o que correlaciona melhor com o aumento de intensidade da adstringência sentida à medida que aumenta a concentração de tanino ingerida (Sarni-Manchado *et al.* 1999; Gambuti *et al.* 2006).

Foram feitos diversos estudos sobre a interacção de taninos com proteínas salivares individuais.

A actividade da α-amilase salivar é inibida na presença de extractos vegetais de taninos hidrolisáveis (Kandra *et al.* 2004; McDougall *et al.* 2005a). Yan e Bennick (Yan *et al.* 1995) também verificaram que a α-amilase é inibida por acido tânico. No entanto, estes autores verificaram que a adição de histatina ou de PRP acídica (numa quantidade em massa semelhante à de α-amilase) protege a α–amilase da inibição por ácido tânico. Estes autores

sugerem que como a massa de PRPs e histatinas na saliva é superior à massa de α-amilase, impedem a inibição desta enzima na saliva pelos taninos.

As histatinas salivares são muito eficientes na formação de agregados insolúveis com diversos polifenóis tais como a EGCG e a PGG (Naurato *et al.* 1999; Wroblewski *et al.* 2001) e o ácido tânico (Yan *et al.* 1995). As histatinas, produzidas tanto nas glândulas da parótida como nas submandibulares/sublinguais poderão ser particularmente importantes na neutralização de taninos que entram na boca em situações de saliva não estimulada (fora das refeições) como é o caso da inalação de poeiras ou partículas contendo taninos (Wroblewski *et al.* 2001).

Recentemente, Mateus *et al.* (2004) estudaram por nefelometria a reactividade de proteínas salivares (PRPs e α-amilase) para com vinho do Porto com diferentes concentrações de procianidinas. Estes autores verificaram que existe um aumento de reactividade de ambas as proteínas com aumento da concentração de procianidinas mas que a α-amilase parece ser mais especifica dado que mostra maiores diferenças de afinidade para diferentes concentrações de procianidina.

Kallithraka *et al.* (1998) analisaram o perfil cromatográfico por HPLC das proteínas salivares de 12 indivíduos em amostras recolhidas imediatamente antes e após degustarem vinhos e soluções de vinho modelo, ambas ricas em taninos e adstringentes (Figura 1-21).

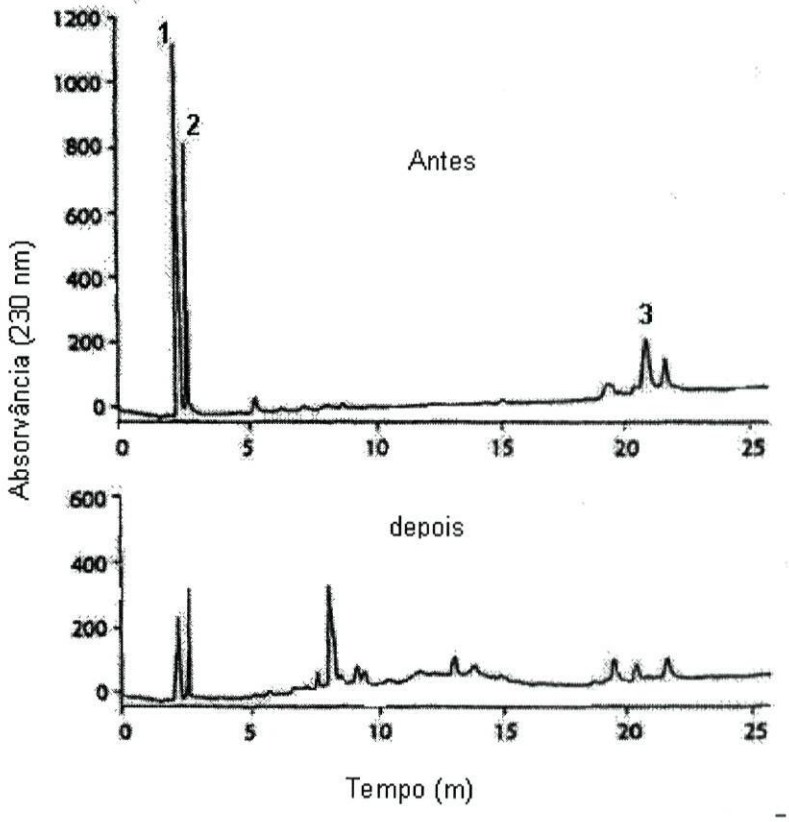


Figura 1-21: Cromatogramas das proteínas salivares de um indivíduo antes e depois de provar uma solução modelo adstringente rica em taninos. Os picos 1, 2 e 3 diminuíram de área após a prova. O pico 1

é atribuído pelos autores a uma PRP glicosilada, o pico 2 é atribuído a uma proteína salivar pobre em prolina e o pico 3 é atribuído a uma PRP hidrofóbica (Kallithraka *et al.* 1998).

Comparando os cromatogramas de HPLC das amostras, verificou-se uma redução da área de três picos em particular, que, segundo os autores, corresponderiam a uma PRP hidrofílica possivelmente glicosilada (pico 1), uma proteína pobre em prolina (pico 2) e uma PRP hidrofóbica (pico 3). A redução da área dos picos foi atribuída a uma precipitação das proteínas após complexação com polifenóis, o que fornece provas que corroboram o mecanismo geralmente aceite da adstringência.

Bacon *et al.* (2000) observaram que todas as PRPs salivares apresentam afinidade para agregarem com diversos taninos hidrolizáveis. No entanto, as PRPs básicas parecem ser as PRPs mais eficazes a precipitar extractos vegetais de taninos condensados (Lu *et al.* 1998).

Lu *et al.* (1998) estudaram a interacção de diversas PRPs básicas de saliva humana (IB1, IB4, IB6 e IB9) na sua interacção com taninos condensados e com ácido tânico. Estes autores verificaram que as proteínas IB4 e IB9 tiveram quase o mesmo efeito na interacção com estes taninos. As proteínas IB1 e IB6 tiveram um efeito ligeiramente inferior. Os autores evidenciam o facto de IB4 e IB9 terem tamanhos semelhantes (56 e 61 aminoácidos), e apesar de partilharem algumas características estruturais, têm sequências de aminoácidos diferentes (ver Figura 1-20). Estes autores chegaram à conclusão que o tamanho e a sequência de aminoácidos das PRPs básicas presentes na saliva humana parecem não influenciar muito a sua capacidade de ligar aos taninos. Esta observação pode explicar o fenómeno referido anteriormente (Secção 1.4.2.1) já que, apesar de cada pessoa apresentar diferentes PRPs básicas na saliva, podendo mesmo não possuir uma dada PRP básica, é pouco provável que afecte capacidade da sua saliva interagir com os taninos (Lu *et al.* 1998).

No entanto, Charlton *et al.* (1996) analisando as constantes de dissociação entre PGG e duas PRPs salivares (uma PRP completa com 70 aminoácidos, IB5, e uma pequena fracção de PRP de rato com 22 aminoácidos, MP5), verificaram que a afinidade de IB5 é muito superior à afinidade de MP5 e sugerem que este aumento de afinidade se deve ao facto de a proteína inteira apresentar maior capacidade de se enrolar à volta do tanino, aumentando a associação por interacções intermoleculares envolvendo múltiplos locais específicos do peptido. Estes autores propõem ainda uma explicação para a presença das diversas sequências de aminoácidos que se encontram repetidos nas PRPs salivares (Figura 1-20B), que correspondem a potenciais locais de ligação repetidos, permitindo um maior número de ligações aos taninos que se fortaleceriam mutuamente.

Simon *et al.* (2003a) propôs que as PRPs salivares básicas se chamassem "tannin sponges" devido a esta sua elevada capacidade de ligar a este tipo de compostos.

1.4.3.1 PRPs enquanto defesa contra efeitos dos taninos

Atendendo ao facto de, por um lado, as PRPs apresentarem uma grande afinidade para complexar os taninos e formarem complexos insolúveis com estes compostos, que se mantêm estáveis mesmo nas condições do estômago e do intestino e, por outro lado, a produção das PRPs poder ser induzida pela ingestão de taninos, poderá significar que as PRPs básicas funcionam como uma linha de defesa primária contra os taninos que poderão apresentar alguns efeitos negativos, nomeadamente na inibição de enzimas digestivas (Shimada 2006). Por outro lado, a formação de complexos proteína-tanino poderá impedir o transporte intestinal dos taninos. De facto, verificou-se que na presença de IB4 existe uma diminuição no transporte de polifenóis através de células intestinais e esta diminuição parece estar relacionada com a formação de complexos insolúveis de IB4-tanino (Cai *et al.* 2006b). Num outro estudo, estes autores verificaram que tanto a histatina como a IB4 impedem a passagem de pentagaloilglucose através das células intestinais, mas que estas proteínas não impedem a passagem de quercetina (Cai *et al.* 2006a). Estes autores sugerem que as proteínas salivares poderiam funcionar como uma protecção contra os efeitos negativos dos taninos, sem afectar a passagem dos flavonóides de pequenas dimensões que, devido às suas propriedades antioxidantes, poderão ter um efeito benéfico no organismo.

Conforme já foi referido na introdução, existe um estudo de Skopec *et al.* (2004) em que se alimentaram ratos com PGG e verificaram que as PRPs salivares complexam com estes taninos e são eliminadas nas fezes. Isto leva a uma perda de azoto, mas esta perda é devida sobretudo à eliminação de proteínas salivares, e não de proteínas da dieta, que contêm aminoácidos essenciais. Este facto também sugere que as PRPs, ao complexar com taninos, protegem os animais dos efeitos destes compostos, minimizando a sua toxicidade.

1.4.4 Factores que influenciam a adstringência

A sensação de adstringência provocada pelos alimentos depende não só de determinadas características do provador mas também das características do alimento provado, como irá ser discutido nas secções seguintes.

1.4.4.1 Características do provador

Verificou-se existirem maiores variações nas avaliações da adstringência de um alimento entre provadores diferentes do que nas avaliações efectuadas por um mesmo provador (Gawel *et al.* 2001). Isto deve-se ao facto de existirem pessoas que sentem a adstringência com mais intensidade do que outras. Esta variação entre provadores pode ser devida a diferenças no fluxo salivar, que pode influenciar o teor de proteína na saliva e outros parâmetros tais como pH.

Aparentemente indivíduos com elevado fluxo salivar sentem menor intensidade de adstringência (Horne *et al.* 2002; Condelli *et al.* 2005; Lesschaeve *et al.* 2005).

Horne *et al.* (2002) efectuaram estudos em que misturaram saliva humana com ácido tânico e mediram por nefelometria o desenvolvimento da turvação. Num primeiro estudo verificaram que o aumento de concentração de ácido tânico levava a um aumento de turvação, e que este aumento de concentração também correlaciona com o aumento de adstringência.

Num segundo estudo, estes autores examinaram as relações entre o fluxo salivar, a formação de turvação e a intensidade da adstringência, e verificaram as seguintes relações:

- Indivíduos com fluxo salivar elevado sentem menor intensidade de adstringência
- Indivíduos com fluxo salivar elevado originam maior turvação na reacção saliva-ácido tânico
- Indivíduos cuja saliva origina maior formação de turvação sentem uma menor intensidade de adstringência.

Os autores propõem que os indivíduos com fluxo salivar elevado e cuja saliva tem maior capacidade de formar agregados terão níveis superiores de proteínas salivares que darão uma maior protecção contra os efeitos adstringentes do ácido tânico.

Condelli *et al.* (2005) usando o mesmo método, também verificaram a mesma correlação. No entanto, estes autores verificaram que a sensação de adstringência não parece ser afectada pela concentração de proteínas totais na saliva, e sugerem que as variações na sensação de adstringência poderá estar relacionada com o teor de proteínas salivares específicas. Estes autores referem ainda a importância de escolher indivíduos com as mesmas características na selecção de um painel de provadores.

Lesschaeve *et al.* (2005) avançaram ainda a hipótese de que as pessoas com maior fluxo salivar teriam uma maior capacidade de repor a lubrificação da cavidade bucal

1.4.4.2 Características do alimento degustado

A adstringência é também afectada por todos os factores que afectam a interacção entre proteínas e taninos referidos anteriormente (Secção 1.3.3). Análises sensoriais demonstraram que a adstringência sentida é afectada pelas características e concentração dos polifenóis presentes no alimento, tais como estrutura, tamanho e conformação espacial (Peleg *et al.* 1999; Horne *et al.* 2002; Monteleone *et al.* 2004; Gambuti *et al.* 2006), pelo pH (Kallithraka *et al.* 1997), pela presença de outras substâncias como a sacarose (Valentova *et al.* 2002), ou os polissacarídeos (Taira *et al.* 1997; Vidal *et al.* 2004a) e ainda pela viscosidade do alimento (Lesschaeve *et al.* 2005).

Os alimentos com uma composição extremamente complexa, como o vinho e a cerveja, apresentam vários descritores sensoriais secundários, variantes da adstringência (macio, granulado, duro, verde, etc., como se pode ver na Roda da Figura 1-16), quando comparadas com sistemas mais simples (soluções de taninos). Estas diferenças podem ser explicadas não só pelo seu perfil polifenólico complexo, mas também pela existência de outros componentes que interferem nesta sensação tais como a acidez, o álcool e sobretudo a presença de outras famílias de compostos como os polissacarídeos (Gawel 1998).

1.4.5 Influência dos polissacarídeos na adstringência

1.4.5.1 Perda de adstringência dos frutos durante o amadurecimento

Durante o amadurecimento do fruto, uma das principais alterações sensoriais é a diminuição da adstringência. Nalguns casos esta perda de adstringência está relacionada com modificações do conteúdo polifenólico (Haslam 1998). Estudos sobre a evolução da composição polifenólica das uvas tintas durante o período que vai do pintor até à maturação mostram que o teor em proantocianidinas totais diminuiu (Mateus *et al.* 2001). No entanto, em alguns frutos não há qualquer alteração da sua composição polifenólica.

A textura é uma das características mais afectadas durante a maturação dos frutos, que se tornam mais moles ou macios ao longo deste período fenológico. Esta modificação é devida sobretudo à degradação enzimática de polissacarídeos estruturais da parede celular (pectina, hemicelulose e celulose) e de polissacarídeos de armazenamento (Huber 1983; Fry 1995; Redgwell *et al.* 1997; Brummell *et al.* 2001; Prasanna *et al.* 2007).

O amolecimento da maioria dos frutos é acompanhado por uma redução da adesão celular, como resultado da degradação da lamela média. As pectinas são constituintes proeminentes da parede celular e são praticamente os únicos constituintes da lamela média (Figura 1-22)

(Wakabayashi 2000; Brummell *et al.* 2001). Portanto, a degradação dos polissacarídeos leva a uma diminuição da integridade das paredes celulares levando a uma perda da firmeza dos tecidos da fruta (Wakabayashi 2000).

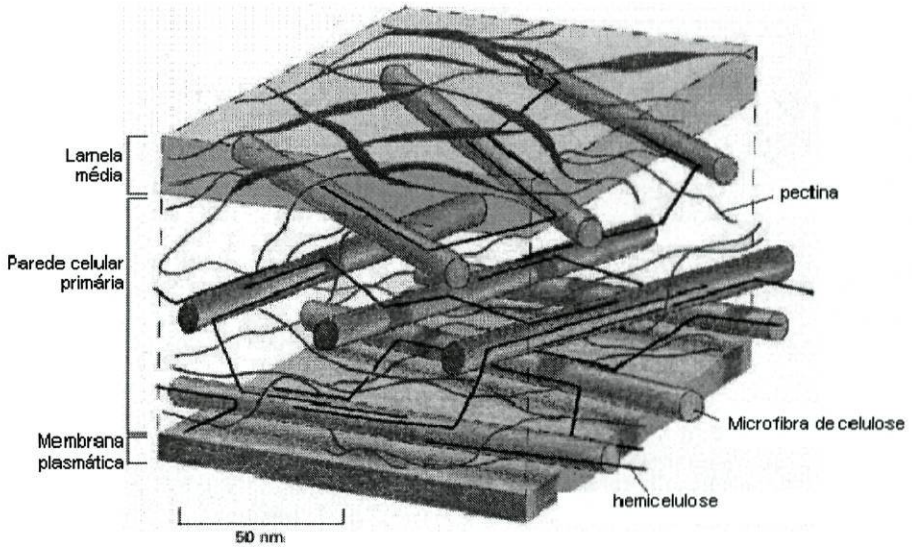


Figura 1-22 Modelo de uma porção de parede celular primária mostrando os polissacarídeos maioritários. A lamela média é rica em pectina e cimenta células adjacentes (Alberts *et al.* 2002).

A pectina é um grupo de polissacarídeos heterogéneo e extremamente complexo, que exibe uma significante heterogeneidade tanto no que se refere à estrutura química como à massa molecular. As pectinas pode conter até cerca de 17 monossacarídeos distintos, organizados em diversas estruturas que formam os polissacarídeos constituintes da pectina: homogalacturonana, xilogalacturonana, ramnogalacturonana (I e II), arabinana e arabinogalactana (I e II) (Vincken *et al.* 2003). Apesar de se conhecerem as estruturas de cada um destes constituintes, não se sabe exactamente como estes se organizam numa estrutura macromolecular. A composição da pectina depende da fonte de onde foi extraída, das condições da extracção e de diversos outros factores (Perez *et al.* 2000).

Apesar de todas estas dificuldades a pectina pode ser descrita em termos gerais como sendo composta de unidades de ácido galacturónico ligados por ligações (1→4), sendo um décimo da cadeia principal composto por ramnose (Belitz *et al.* 1987). Nas cadeias laterais podem surgir pequenas quantidades de galactanas, arabinanas, fucose e xilose. Os grupos carboxilo dos ácidos galacturónicos da cadeia principal encontram-se esterificados com metanol em percentagens variáveis. Na Figura 1-23 pode-se ver um esquema representativo dos principais constituintes da pectina.

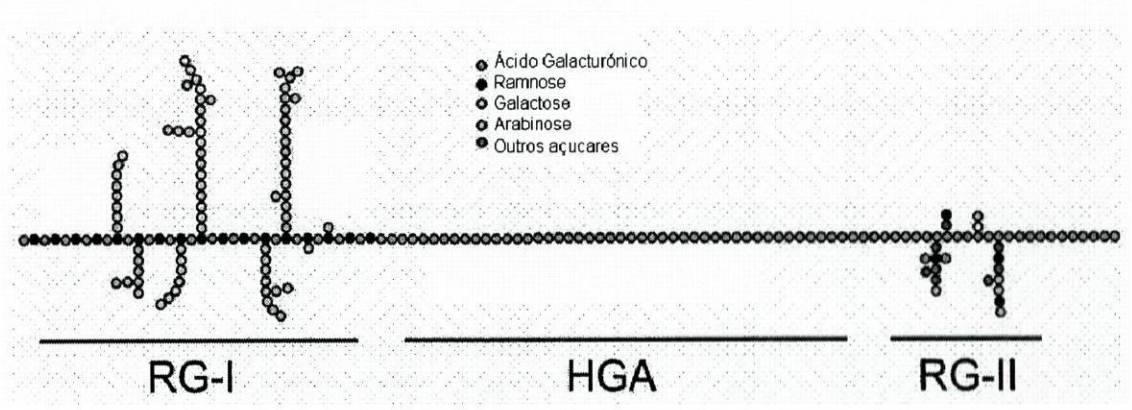


Figura 1-23: Diagrama esquemático simplificado de algumas características da pectina: HGA-homogalacturonana, RG-I/II: Ramnogalacturonana I/II. Pensa-se que RGI e RGII estão ligados covalentemente a HGA (Willats *et al.* 2001).

As pectinas parecem sofrer uma despolimerização e desesterificação catalizada por enzimas durante o amadurecimento e as grandes moléculas insolúveis presentes antes do amadurecimento degradam-se, formando-se pequenas moléculas solúveis (Figura 1-24) (Wakabayashi 2000).

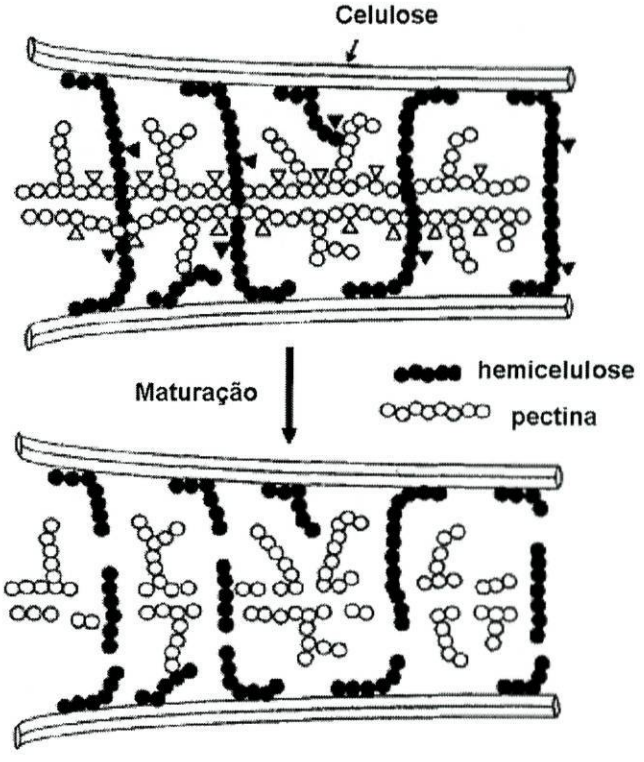


Figura 1-24: Representação esquemática da quebra e degradação de polissacarídeos durante a maturação da fruta através da acção de enzimas (▼ e ▽) (Wakabayashi 2000).

A observação de que alguns polissacarídeos, nomeadamente poligalacturonato e pectinas, são capazes de romper a ligação proteína-tanino levou à sugestão de um mecanismo alternativo para a perda de adstringência com o amadurecimento (Ozawa *et al.* 1987; Luck *et al.* 1994):
É provável que nalguma fruta, a perda de adstringência durante a maturação possa estar relacionada com a produção de quantidades significativas de fragmentos de pectina solúveis em água. Estes polissacarídeos têm presumivelmente a estrutura apropriada para competir com as proteínas da mucosa e da boca na complexação com os taninos. A inibição da formação de complexos proteína-tanino na boca pelas pectinas poderá estar na origem da diminuição da adstringência.
Esta hipótese será objecto de estudo neste trabalho.

1.4.5.2 Inibição da interacção entre proteínas e taninos por polissacarídeos

De facto, um dos factores que influencia a interacção entre proteínas e taninos é a presença de polissacarídeos em solução.
Gafney *et al.* (1986) estudaram a interacção num sistema modelo constituído por cafeína, β-ciclodextrina e polifenóis naturais. A β-ciclodextrina é um oligosacarídeo cíclico composto por sete resíduos de glucose ligados por ligações (1→4). Este composto assume a forma de um "donut" com uma cavidade em forma de "V" com propriedades hidrofóbicas (Figura 1-25 A) (Haslam 1998). Uma das características mais importantes da ciclodextrina é a sua capacidade de encapsular substratos na cavidade hidrofóbica. Estes autores constataram que as ciclodextrinas se ligam facilmente a flavan-3-ois, aparentemente através da encapsulação dos anéis A e B na cavidade das ciclodextrinas (Figura 1-25 B) (Haslam 1998).
Gafney *et al.* (1986) verificaram que na presença de ciclodextrina, a PGG se separa da superfície da cafeína devido a uma complexação competitiva entre o polifenol e a ciclodextrina. Estes autores sugerem que a associação dos polifenóis com proteínas é passível de ser modificada pela presença de polissacarídeos que tenham a capacidade de desenvolver uma estrutura secundária em solução que contenha cavidades hidrofóbicas.

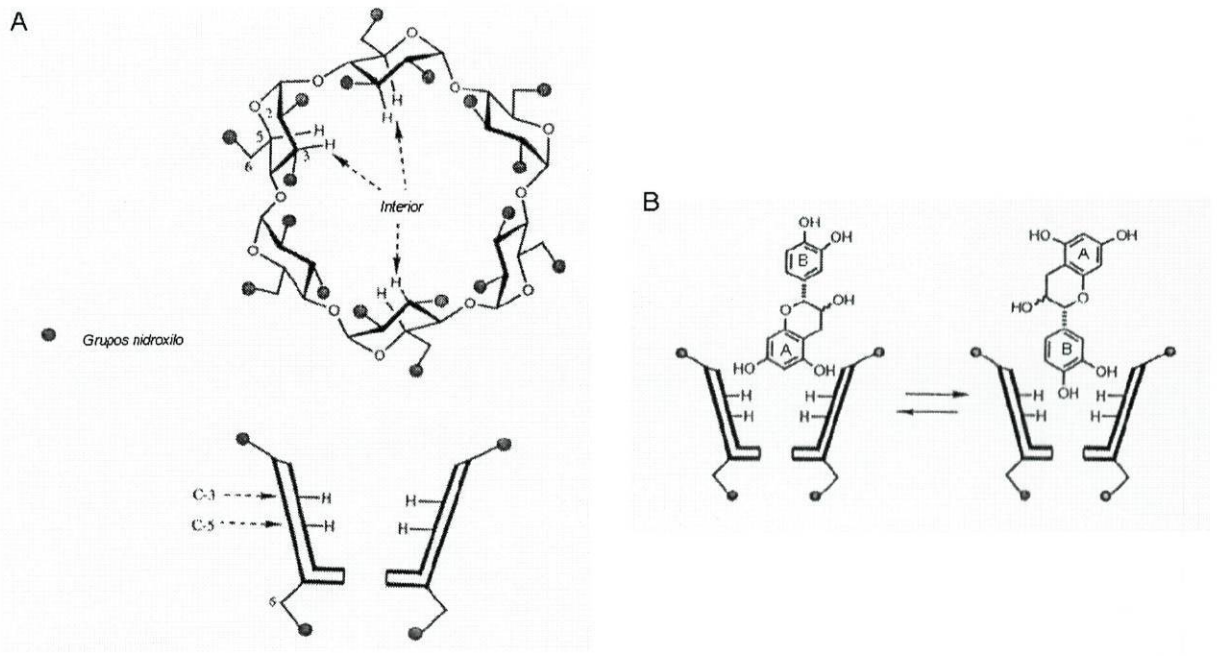


Figura 1-25: Representação da molécula de α-ciclodextrina (A) e possíveis modos de complexação de flavanóis com moléculas de ciclodextrinas (B) (Haslam 1998).

Ozawa *et al.* (1987) estudaram a inibição da enzima β-glucosidade por parte de vários polifenóis e verificaram que dois polissacarídeos (o poligalacturonato de sódio e a ciclodextrina) têm a capacidade de diminuir a inibição desta enzima por parte dos polifenóis.

Luck *et al.* (1994) verificaram a existência de diversos polissacarídeos que inibem a interacção entre a gelatina e um tanino hidrolisável, a PGG (Tabela 1-4).

A percentagem de inibição da precipitação de PGG-gelatina varia com as características do polissacarídeo. A pectina, a goma arábica, o xantano e a gelana foram eficazes a prevenir a precipitação. As galactomananas goma de alfarroba, goma de guar e goma de tara não foram capazes de inibir a precipitação. No entanto, a alfarroba e a goma de tara apresentam um efeito sinérgico na inibição exercida pelo xantano na precipitação PGG-gelatina. Uma explicação avançada por estes autores é o facto das galactomananas formarem complexos com xantano produzindo estruturas semelhantes a gel para valores de concentração muito mais baixos do que aqueles que seriam necessárias com o polissacarídeo sozinho (Luck *et al.* 1994).

Tabela 1-4: Efeitos inibidores de diversos carboidratos na precipitação de PGG por gelatina (Luck *et al.* 1994).

Carboidrato	*% de redução na precipitação de PGG-gelatina*
Gelano[a]	56
Goma arábica[a]	61
Ácido poligalacturónico[a]	62
Pectina solúvel[a]	40
Dextrano (Mr~40000) [a]	11
Glucose[b]	2
Xantano[a]	22
Goma de alfarroba[a]	2
Goma de tara[a]	0
Goma de guar[a]	0
Goma de alfarroba + xantano [c]	55-91[d]
Goma de tara + xantano [c]	30-95 [d]
Goma de guar + xantano [c]	0

PGG, 10 μM; gelatina, 0,2 μM; polissacarídeo: a: 20 $\mu g.cm^{-3}$ de polissacarídeo, b: concentração molar de glucose equivalente à concentração de sub-unidades de glucose presentes no dextrano; c: 98 $\mu g.cm^{-3}$ de polissacarídeos totais, d: gama de reduções observadas para ratios de galactomanana:polissacarídeo de 1:4 até 4:1.

1.4.5.3 Mecanismos da inibição da interacção entre proteínas e taninos por polissacarídeos

Foram propostos dois mecanismos para explicar o fenómeno da inibição da formação de agregados insolúveis proteína-tanino pelos polissacarídeos em sistemas aquosos (Luck *et al.* 1994; Haslam 1998):

i) Os polissacarídeos são, no geral, polielectrólitos, ou seja, são macromoléculas que contêm grupos carregados na sua constituição. A presença destas cargas torna este tipo de compostos altamente solúveis em água. O polissacarídeo poderia formar um complexo ternário [proteína-tanino-polissacarídeo] com a proteína e o tanino, que seria facilmente solvatado devido ao carácter iónico dos polissacarídeos, e por isso mais solúveis.

ii) Por outro lado, a capacidade de formar estruturas do tipo gel em solução poderia levar a situações em que os taninos seriam encapsulados e impedidos fisicamente de interagir com as proteínas. Assim, o polissacarídeo, se tiver uma estrutura

terciária adequada em solução, pode encapsular os taninos, total ou parcialmente, e impedir a interacção com a proteína.

Em consonância com o primeiro mecanismo, verificou-se que alguns dos polissacarídeos mais eficientes na inibição das interacções proteína-tanino são polielectrólitos (goma arábica, ácido poligalacturónico) (Haslam 1998).

Em defesa do segundo mecanismo, é interessante salientar o efeito do xantano. O xantano é uma heteroglicana constituída de glucose, manose e ácido glucurónico. A sua estrutura consiste numa cadeia principal de glucose ligada por ligações (1→4), mas em que cada resíduo alternado contém uma cadeia lateral trissacarídea ligada na posição 3 (Belitz *et al.* 1987). Em solução, o xantano adopta uma estrutura ordenada na qual a cadeia principal adopta uma estrutura helicoidal em que as cadeias laterais trissacarídeas se alinham ao longo da cadeia principal (Figura 1-26).

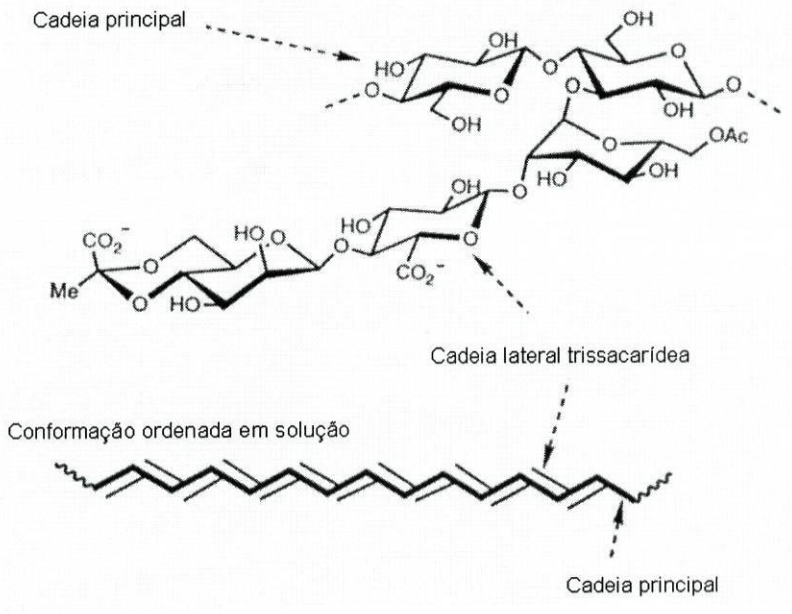


Figura 1-26: Estrutura do xantano e visualização da conformação ordenada em solução (Haslam 1998).

O xantano em solução forma associações laterais de cadeias ordenadas, dando origem a uma rede ordenada, com características semelhantes a um gel, já que tem a capacidade de suportar partículas em suspensão.

Os polifenóis poderiam ser então encapsulados pelos poros formados pelas estruturas ordenadas de xantano em solução, ficando impossibilitados de complexar com proteínas (Figura 1-27).

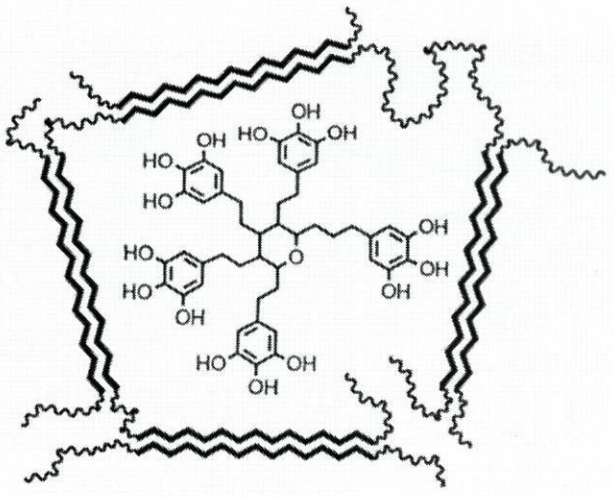


Figura 1-27: Representação esquemática da encapsulação de um polifenol (PGG) nos poros formados pela estrutura ordenada formada numa solução aquosa de xantano (Haslam 1998).

Os estudos quantitativos e estruturais da ligação de polifenóis a polissacarídeos têm sido dificultados pela falta de polissacarídeos solúveis com pesos moleculares e estruturas bem definidas. No entanto, em estudos usando diversos polifenóis [(-)-epicatequina, dímero B3, tri-, tetra- e pentagaloilglucose e vescalagina] e géis cromatográficos baseados em dextrano (Sephadex), verificou-se que a afinidade destes polifenóis para com os géis é fortemente influenciada pela estrutura do polifenol. De facto, verificou-se que a força de ligação é afectada fortemente pelo peso molecular e pela flexibilidade conformacional dos polifenóis, em que os polifenóis maiores e os mais flexíveis são os que têm uma maior afinidade para com o gel de Sephadex e ficam mais facilmente retidos. Estas interacções podem envolver ligações hidrogénio ou o sequestro de anéis benzénicos ou moléculas inteiras em cavidades ou poros do gel (Haslam *et al.* 1988; Haslam 1998).

Por outro lado, polissacarídeos lineares como o dextrano ligam aos polifenóis muito fracamente enquanto que a amilose, que consegue formar estruturas secundárias com cavidades hidrofóbicas, tem maior afinidade (Haslam *et al.* 1988).

Num outro trabalho onde se estudaram as interacções de procianidinas com diversos polissacarídeos (Le Bourvellec *et al.* 2005), verificou-se uma afinidade superior para os polissacarídeos com "bolsos hidrofóbicos" (uma pectina modificada) do que em polissacarídeos globulares ou filamentosos (como a celulose e o xiloglucano)

Taira *et al.* (1997) estudaram os efeitos da pectina solúvel na adstringência do diospiro. Estes autores observaram que a adstringência de sumo de diospiro e de uma solução de taninos purificados de diospiro diminuiu significativamente pela adição de pectina, e concluíram que este fenómeno se deve ao facto da pectina se complexar com os taninos. Por outro lado, foram

provadas amostras de diospiro em diversos estados de amolecimento (maturação) e verificaram que a adstringência diminuía com o amolecimento apesar da concentração de taninos se manter praticamente constante entre as fases de maturação estudadas.

Hayashi *et al.* (2005) estudaram o efeito da pectina na adstringência de catequinas presentes no chá por espectroscopia de RMN e utilizando um sensor de adstringência baseado na medição de diferenças de potencial eléctrico entre uma solução de tanino e uma solução de referência. A análise do sensor revelou que a adstringência de galhocatequinas (EGCG e ECG) foi reduzida pela adição de pectinas, enquanto que a adstringência de catequinas (do tipo "não-galhato") [(-)-epigalhocatequina e (-)-epicatequina] se manteve praticamente inalterada. Por outro lado, e com base nas alterações no deslocamento químico nos espectros RMN das catequinas e pectina em soluções de misturas, os mesmos autores verificaram que as catequinas galoiladas têm uma maior afinidade para formarem complexos com pectina do que as não galoiladas. Estes resultados de RMN demonstram que a formação de complexos catequina-pectina pode ser um factor na redução da adstringência.

Um estudo recente da actividade enzimática da α–amilase salivar humana (Zajacz *et al.* 2007) mostrou que uma mistura de taninos gálhicos (glucose esterificada com 2 a 6 unidades de acido gálhico, em que 7% da mistura corresponde a taninos elágicos) tem a capacidade de inibir a actividade da α–amilase não só por se ligar à proteína, mas também por se ligar ao substrato, a amilose.

1.4.5.4 Polissacarídeos do vinho

Conforme já foi referido, uma bebida onde os fenómenos de adstringência são extremamente importantes é o vinho tinto. Os vinhos tintos são ricos em polifenóis mas contém também diversos outros componentes que podem influenciar a adstringência, entre os quais os polissacarídeos.

Os polissacarídeos constituem um dos principais grupos de macromoléculas do vinho. Podem ter origem tanto na uva como em microrganismos. Os que existem em maiores quantidades são as arabinogalactana-proteínas (AGPs) e as ramnogalacturonanas do tipo II (RGII), que provêem de pectinas nativas da parede celular da uva após degradação por pectinases e as manoproteínas (MP) que são produzidas por leveduras (*S. cerevisae*) durante e após a fermentação (Doco *et al.* 2000). Os polissacarídeos do vinho podem ter um efeito prejudicial na performance das membranas de microfiltração do vinho (Vernhet *et al.* 1999), podem

proteger o vinho da formação de turvação proteica e têm um efeito de colóides protectores (Doco *et al.* 2000).

As AGPs representam uma parte importante dos polissacarídeos solúveis totais: entre 100-200 mg/L em vinhos tintos e 50-150 mg/L em vinho branco (Doco *et al.* 2000).
Estruturalmente são baseados num núcleo interior de (1→3) D-galactana com cadeias laterais de D-galactana ligadas em (1→6), altamente substituídas por resíduos de arabinofuranose e com quantidades menores de arabinopiranose, ramnose, xilose, ácido glucorónico e o seu éster de metilo. A porção polipeptídica representa 3,5-13% da molécula e contêm tipicamente hidroxiprolina, glicina, serina e alanina como aminoácidos principais (Pellerin *et al.* 1995).

A RGII é um polissacarídeo ácido, complexo e com um grau de polimerização fraco (~30). O teor médio em vinhos tintos é de 100-150 mg/L e em vinhos brancos de 20-50 mg/L, representando cerca de 20% dos polissacarídeos totais num vinho tinto.
A RGII é formada por uma cadeia principal de 8 resíduos de acido galacturónico sobre a qual se vêm ligar 4 cadeias secundárias. É constituído por 12 resíduos distintos que incluem ácido galacturónico, ácido glucurónico, ramnose, galactose, arabinose e fucose, bem como vários açúcares raros, que são diagnósticos da presença de RGII, tais como apiose, acido acérico (3-C-carboxi-5-deoxixilose), 2-O-metilfucose, 2-O-metilxilose, ácido 3-desoxi-D-*lixo*-2-heptulosárico (Dha), e acido 3-desoxi-D-*mano*-octulosónico (Kdo). Estes resíduos estão ligados entre si por mais de vinte ligações glicosídicas diferentes. A RGII existe no vinho predominantemente na forma de um dímero, em que duas moléculas de RGII estão ligadas covalentemente através de ligações ester com borato (Pellerin *et al.* 1996; Doco *et al.* 2000; O'Neill *et al.* 2004).
O teor dos polissacarídeos pécticos RGII e AGPs altera-se durante o armazenamento do vinho (Doco *et al.* 1999).

As manoproteínas são polissacarídeos produzidos pela levedura *Saccharomyces cerevisae* e são abundantes nos vinhos (150 mg/L) (Doco *et al.* 2000). No entanto, o conteúdo de manoproteínas de um vinho depende dos processos de vinificação (Doco *et al.* 2003) e da estirpe de levedura utilizada (Escot *et al.* 2001).
As manoproteínas representam cerca de 30% dos polissacarídeos totais de um vinho, com massas moleculares que vão dos 50 aos 560 kDa. São compostas quase só por manose e fracção proteica, podendo conter também glucose (Gonçalves *et al.* 2002).

As manoproteínas do vinho têm um papel muito importante no processo de vinificação, contribuindo, entre outras coisas, para a inibição da cristalização de sais de tartarato de potássio, para uma melhor conservação das características aromáticas, estabilidade fenólica e diminuição da turvação proteica (Waters *et al.* 1994; Caridi 2006).

De facto, Escot *et al.* (2001) verificou que a adição de manoproteínas levou a uma diminuição da adstringência (menor reactividade dos taninos com a gelatina) devido à formação de complexos tanino-manoproteína. Este efeito foi verificado especialmente com manoproteínas derivadas de fermentação alcoólica. Os autores sugerem ainda que estes polissacarídeos complexam com antocianinas e taninos e previnem a sua precipitação, melhorando como consequência a estabilidade da cor.

Foram estudadas as características sensoriais de polissacarídeos do vinho, uma fracção contendo uma mistura de AGPs e MPs neutras e a outra fracção contendo RGII (Vidal *et al.* 2004b).

Um painel de provadores provou estes polissacarídeos dissolvidos em solução modelo de vinho (solução aquosa de etanol a 13%, saturada com ácido tartárico a pH 3,6), em concentrações que normalmente são encontradas no vinho. Ambas as fracções conferiram uma sensação de "estrutura e corpo" (características de um vinho aveludado) relativamente à solução de referência (sem polissacarídeos), que foi considerada pelos provadores como adstringente. Esta sensação foi detectada pelos provadores, apesar de a solução modelo não ter taninos, provavelmente devido ao efeito do etanol e do ácido. As fracções de polissacarídeos diminuíram os atributos adstringentes do vinho modelo, especialmente a fracção de RGII. Os autores não atribuem este efeito à viscosidade dado que a fracção de polissacarídeos neutros tinha uma viscosidade duas vezes superior à de RGII.

1.5 Métodos de estudo das interacções entre proteínas e polifenóis

A interacção dos polifenóis com as proteínas tem sido estudada por diversos métodos, que tanto se focam nestas interacções a um nível molecular como a um nível "macroscópico".

Entre estes métodos podem-se encontrar técnicas de RMN (Murray *et al.* 1994b; Wroblewski *et al.* 2001; Charlton *et al.* 2002b; Simon *et al.* 2003a), microcalorimetria (Beart *et al.* 1985; Frazier *et al.* 2003), inibição enzimática (Ozawa *et al.* 1987; Fickel *et al.* 1999; Kandra *et al.* 2004), nefelometria (Chapon 1993; Siebert *et al.* 1996; de Freitas *et al.* 2001; Horne *et al.* 2002; Monteleone *et al.* 2004), dispersão de luz (Jobstl *et al.* 2004; Lin *et al.* 2004; Poncet-Legrand *et al.* 2006), técnicas de microscopia (Jobstl *et al.* 2004; Jobstl *et al.* 2006; Poncet-Legrand *et al.* 2006), precipitação de BSA marcada radioactivamente (Hagerman *et al.* 1980; Asquith *et al.* 1986), HPLC (Kawamoto *et al.* 1996; Kallithraka *et al.* 1998), fluorescência (Papadopoulou *et al.* 2005), electroforese (Yan *et al.* 1995; Papadopoulou *et al.* 2004; Gambuti *et al.* 2006), espectrometria de massa (Sarni-Manchado *et al.* 2002; Simon *et al.* 2003a), espectroscopia de infravermelho (Edelmann *et al.* 2002), espectrofotometria (Luck *et al.* 1994), utilização de taninos marcados com peroxidase (Bacon *et al.* 1998), hemanalise (determinação colorimétrica de hemoglobina) (Bate-Smith 1973) ou ainda por modelação molecular (Simon *et al.* 2003a).

Edelmann *et al.* (2002) desenvolveram uma "língua electrónica" para medir a adstringência baseada nas interacções entre taninos e proteínas usando um sistema de injecção automatizado com espectroscopia de FTIR (Fourier Transform Infrared). O sistema consiste numa célula de fluxo na qual são colocadas esferas de agarose contendo gelatina. As amostras são injectadas e a retardação dos taninos (causada por interacções com a gelatina) é monitorizada por infravermelho. Estes autores estudaram taninos de diferentes fontes (uva, barris de madeira, formulações enológicas) e verificaram diferenças significativas nos respectivos espectros como resultado da diferença de afinidade destes taninos para com a gelatina. O sensor revelou sensibilidade mesmo em matrizes complexas como o vinho tinto.

Uma das técnicas mais fáceis e intuitivas de medir a formação de agregados proteína-tanino em solução é pela medição da luz dispersa por esses agregados usando, por exemplo, um nefelómetro. A nefelometria foi usada pela primeira vez com esta finalidade em meados do século XX (Chapon *et al.* 1961), mas mais recentemente a sua utilização foi retomada para estudar as interacções proteína tanino (Chapon 1993; Siebert *et al.* 1996; Siebert *et al.* 2000; de Freitas *et al.* 2001, 2002; Horne *et al.* 2002; Mateus *et al.* 2004; Monteleone *et al.* 2004; Condelli *et al.* 2005). Recentemente o grupo de Monteleone (Monteleone *et al.* 2004;

Condelli *et al.* 2005) verificou a existência de uma correlação linear entre a adstringência de vinhos e a resposta nefelómetrica in vitro da reacção entre os polifenóis extraídos desses vinhos e a mucina (Figura 1-18), evidenciando que o método desenvolvido poderá servir para prever a adstringência do vinho.

Estudos nefelométricos sobre a interacção entre procianidinas e proteínas mostram que a formação de agregados pode ser dividida em duas fases distintas (Figura 1-28): numa primeira fase ocorre a formação progressiva de agregados tanino/proteína até que se atinge um máximo e, numa segunda fase deixam de se formar mais complexos e a turbidez da solução mantém-se constante.

Este fenómeno pode ser explicado pela ligação progressiva de polifenóis às proteínas, aumentando o grau de agregação e com o consequente aumento gradual da turbidez da solução. À medida que os locais de ligação vão sendo preenchidos, o complexo proteína-tanino vai se tornando cada vez maior, até se atingir um valor máximo de turbidez. O acesso a esses locais depende da estrutura da proteína e do polifenol, mas também de outros factores como já foi discutido anteriormente.

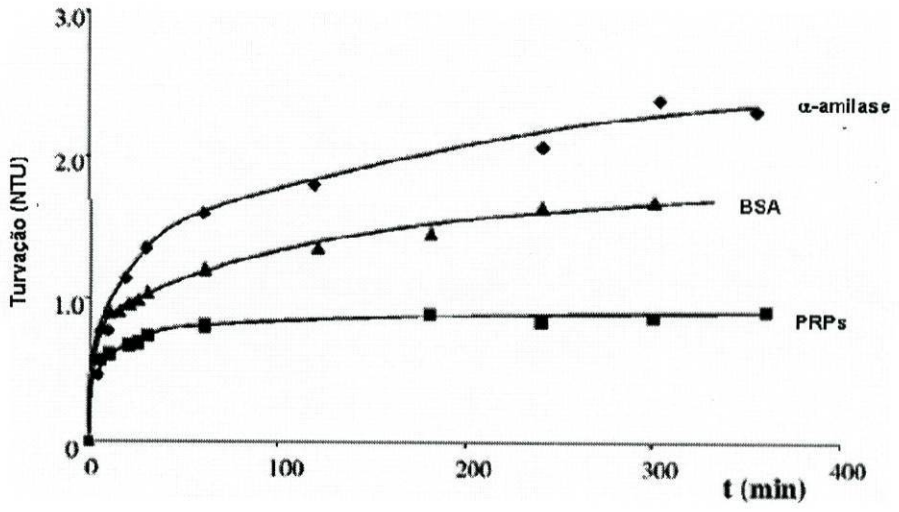


Figura 1-28: Evolução ao longo do tempo da turvação resultante das interacções entre proteínas e procianidinas oligoméricas (0,2 g.L^{-1}) em solução de etanol/água 12% (v/v), pH 5,0. PRPs, 48 μg; α-amilase, 132 μg; BSA, 60 μg (de Freitas *et al.* 2002).

1.5.1 Proteínas utilizadas no estudo das interacções com polifenóis

A BSA tem sido muito usada como proteína modelo neste tipo de estudos (Hagerman *et al.* 1980; McManus *et al.* 1985; Kawamoto *et al.* 1996; Naczk *et al.* 1996; Serafini *et al.* 1997; Hatano *et al.* 2003; Lin *et al.* 2004; Papadopoulou *et al.* 2005; Frazier *et al.* 2006). Diversas

proteínas de saliva humana foram também utilizadas neste tipo de ensaios, conforme já foi discutido na Secção 1.4.3.

Outras proteínas têm sido usadas como modelo por terem características que as tornam semelhantes a proteínas ricas em prolina, tais como a caseína (Luck *et al.* 1994; Jobstl *et al.* 2004), a gelatina (Calderon *et al.* 1968; Ricardo da silva *et al.* 1991; Luck *et al.* 1994; Siebert *et al.* 1996; Edelmann *et al.* 2002), a poliprolina (Hagerman *et al.* 1981; Ricardo da silva *et al.* 1991; Poncet-Legrand *et al.* 2006), e o polímero polivinilpolipirrolidona (Hagerman *et al.* 1981; Laborde *et al.* 2006). A mucina (Monteleone *et al.* 2004), a gliadina (Siebert *et al.* 1996), a β-glucosidase (Haslam 1974; Ozawa *et al.* 1987) e a hemoglobina (Bate-Smith 1973) têm sido também utilizadas por vários autores.

1.5.2 Compostos polifenólicos utilizados em estudos de interacção com proteínas

As interacções entre proteínas e polifenóis têm vindo a ser estudadas usando os mais variados tipos de compostos polifenólicos.

As proantocianidinas têm sido muito utilizadas por diversos autores, tanto os compostos puros (Artz *et al.* 1987; Ricardo da silva *et al.* 1991; Hatano *et al.* 1996; Hagerman *et al.* 1998; de Freitas *et al.* 2001; Kallithraka *et al.* 2001; Sarni-Manchado *et al.* 2002; Simon *et al.* 2003a), como misturas de proantocianidinas e extractos de grainha de uva (Hagerman *et al.* 1981; de Freitas *et al.* 2001; Edelmann *et al.* 2002; Maury *et al.* 2003; Condelli *et al.* 2005; Gambuti *et al.* 2006).

Outros estudos usam flavanóis monómericos (Siebert *et al.* 1996; Bacon *et al.* 1998; Papadopoulou *et al.* 2005; Frazier *et al.* 2006; Poncet-Legrand *et al.* 2006), dos quais a EGCG, um componente maioritário do chá, tem sido amplamente estudada (Naurato *et al.* 1999; Wroblewski *et al.* 2001; Charlton *et al.* 2002a; Hatano *et al.* 2003; Jobstl *et al.* 2006).

Existem também vários estudos focados em taninos hidrolisáveis (Frazier *et al.* 2003; Hatano *et al.* 2003), nomeadamente o ácido tânico (Siebert *et al.* 1996; Lu *et al.* 1998; Bacon *et al.* 2000; Lin *et al.* 2004; Llaudy *et al.* 2004), e a PGG (Luck *et al.* 1994; Murray *et al.* 1994b; Baxter *et al.* 1997; Kawamoto *et al.* 1997a; Hagerman *et al.* 1998; Naurato *et al.* 1999; Horne *et al.* 2002; Verge *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004).

2 OBJECTIVOS

Um dos efeitos que influencia a interacção entre proteínas e taninos e que pode ser extremamente importante no que se refere à adstringência dos alimentos é a presença de polissacarídeos em solução. Este fenómeno não tem sido muito estudado, e os poucos estudos que existem referem-se a taninos hidrolisáveis, que não são os mais comuns nos alimentos (Ozawa *et al.* 1987; Luck *et al.* 1994). O objectivo principal desta tese foi o de obter mais dados relativamente aos efeitos dos polissacarídeos nas interacções entre as procianidinas e as proteínas, e de que modo estes efeitos se poderiam relacionar com a adstringência dos alimentos. Para este efeito procederam-se aos seguintes passos:

1. *Obtenção de proteínas, taninos e polissacarídeos.*
    - Isolar procianidinas de grainha de uva (não só porque são muito ricas neste tipo de compostos mas também devido ao historial do grupo de investigação em que este trabalho foi efectuado)
    - Obter proteínas salivares: síntese química de uma PRP salivar básica e isolamento de α-amilase salivar humana
    - Isolar polissacarídeos a partir de um vinho.
2. *Estudos por nefelometria das interacções proteína-tanino*
    - Estudar as interacções das procianidinas com proteínas usando um sistema modelo de BSA (uma proteína largamente utilizada para este tipo de estudos e que se encontra disponível comercialmente em grandes quantidades);
    - Obter dados relativos aos diversos efeitos que influenciam estas interacções, tais como concentrações relativas de proteína e tanino e efeito da força iónica;
    - Uma vez definidas as condições experimentais, estudar os efeitos de diversos polissacarídeos.
3. *Desenvolvimento de um novo método nefelométrico em continuo*
    - Desenvolver uma técnica que permita obter resultados mais eficientemente;
    - Aplicar a técnica a diferentes compostos e sistemas, bem como aplicação à análise directa de vinhos.
4. *Utilização de um fluorímetro como método sensível de analisar interacções proteína-tanino*
    - Uma vez adquirido o "know how", utilizar os compostos que provavelmente estão directamente envolvidos na adstringência de, por exemplo, um vinho: proteínas salivares, procianidinas de grainha de uva e polissacarídeos do vinho;

- Definir condições experimentais e efectuar estudos sobre as concentrações relativas de proteína e tanino e sobre o efeito da força iónica;
- Pela primeira vez, estudar a influência de polissacarídeos de vinho na interacção entre proteínas salivares e procianidinas, permitindo obter dados físico-químicos sobre um fenómeno que há já muito tempo é mencionado por enólogos: os polissacarídeos contribuem para o sabor do vinho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e purificação de compostos polifenólicos

3.1.1 Extracção de procianidinas de grainha de uva

Os taninos condensados foram extraídos de grainhas de uva (*Vitis vinifera*). As grainhas (40g) foram trituradas durante 10 minutos em 500 mL de solução hidroalcoólica (50% de etanol/água, v/v com 1 $g.L^{-1}$ de $Na_2S_2O_5$), com a ajuda de um Ultra-Turrax®, e deixadas a macerar por cerca de 10h. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm e o sobrenadante concentrado num evaporador rotativo a pressão reduzida (30°C) até perfazer um volume de cerca de 200 ml. A solução obtida foi extraída com clorofórmio (3x100 ml). A camada de clorofórmio que contém os lípidos, carotenóides e clorofilas foi eliminada e a camada hidroalcoólica contendo os polifenóis foi concentrada até perfazer um volume de cerca de 150 ml, usando um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 30°C, de modo a eliminar o etanol e restos de clorofórmio. Os polifenóis presentes na solução resultante foram extraídos com acetato de etilo (3x150 ml), e a solução novamente concentrada até perfazer um volume de cerca de 200 ml. Um extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas foi obtido de seguida por precipitação após adição de 250 ml de hexano, de acordo com o método descrito por Michaud (1971).

3.1.1.1 Purificação das procianidinas oligoméricas por cromatografia líquida

O extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas foi eluído numa coluna de cromatografia de gel TSK Toyopearl HW-40(s) (250x16 mm i.d) usando metanol como eluente a um fluxo de 0,8 ml/min (de Freitas *et al.* 1998). Os primeiros 120 ml, correspondentes às catequinas monoméricas (+)-catequina e (-)-epicatequina, foram eliminados. A eluição foi seguida ao longo de 10 horas de modo a obter as procianidinas oligoméricas (PCO). O solvente foi eliminado no evaporador rotativo (30°C), e o resíduo obtido, correspondente às PCO foi dissolvido em água desionizada, congelado e liofilizado.

3.1.1.2 Fraccionamento do extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas por cromatografia líquida

De modo a obter várias fracções de procianidinas com pesos moleculares mais definidos procedeu-se ao fraccionamento do extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas obtido na Secção 3.1.1. O extracto (3,0 g) foi fraccionado através duma coluna de gel TSK

Toyopearl HW-40(s) (100x16 mm d.i.), usando metanol e metanol/acido acético a um fluxo de 0,8 $ml.min^{-1}$ como eluente. Isolaram-se 5 fracções de acordo com as condições descritas na Tabela 3-1. No final, o solvente de cada fracção foi eliminado no evaporador rotativo (30°C), e os resíduos obtidos foram dissolvidos em água desionizada, congelados e liofilizados.

Tabela 3-1: Condições de fraccionamento do extracto enriquecido em procianidinas oligoméricas e as quantidades de procianidinas obtidas de cada fracção.

Fracção	*Solvente*	*Tempo eluição (hh:mm)*	*Quantidade obtida (g)*
I	Metanol	00:30-01:30	1,8
II	Metanol	01:30-02:30	0,53
III	Metanol	02:30-07:30	0,22
IV	Metanol/ácido acético 95/5 (v/v)	07:30-21:30	0,12
V	Metanol/ácido acético 90/10 (v/v)	21:30-29:30	0,029

3.1.1.3 Caracterização das procianidinas por espectrometria LSI-MS

Uma pequena quantidade de cada fracção de procianidina foi dissolvida em metanol anidro e misturada com uma matriz de glicerol. O espectro LSI-MS de cada fracção foi obtido em modo negativo usando um espectrómetro VG Autospec EQ, equipado com um canhão de iões de césio (feixe de 35 keV) e calibrado com iodeto de césio (200-3500 Da), conforme descrito na literatura (de Freitas *et al.* 1998).

Na Tabela 3-2 pode-se ver a composição das diferentes fracções obtidas, bem como uma estimativa do peso molecular médio de cada fracção, calculado como a média simples dos pesos moleculares obtidos.

Tabela 3-2: Flavan-3-óis maioritários identificados por LSI-MS nas fracções de grainha de uva eluídas da coluna de gel Toyopearl.

Fracção	*Flavan-3-ol identificado (m/z, $[M+H]^+$)*	*PM médio*
I	Monómeros (291), monómeros galhato (443), dímeros (579)	437
II	Dímeros (579), dímeros galhato (731), trímeros (867), trímeros galhato (1019), tetrâmeros (1155)	870
III	Dímeros galhato (731), trímeros (867), trímeros galhato (1019), tetrâmeros (1155), tetrâmeros galhato (1307), pentâmeros (1443)	1087

IV	Tetrâmeros digalhato (1459), pentâmeros galhato (1595)	1527
V	1600 < Mr < 3500	2500
PCO:	Monómeros galhato (443), dímeros (579), dímeros galhato (731), trímeros (867), dímeros digalhato (883), trímeros galhato (1019), tetrâmeros (1155), tetrâmeros galhato (1307), pentâmeros (1443), pentâmeros galhato (1595)	1002

3.1.2 Preparação de um extracto de película

Submeteram-se as películas de uvas tintas (*Vitis vinifera)* a uma extracção com uma solução hidroalcoólica (40% de etanol em água v/v) durante 24 horas. Depois de filtrado, o etanol foi evaporado sob pressão reduzida, usando um evaporador rotativo (30°C) e a amostra foi congelada e liofilizada.

3.2 Isolamento e Síntese de Proteínas

3.2.1 Síntese de IB8c

3.2.1.1 Síntese química em fase sólida

A síntese química em fase sólida do péptido IB8c foi efectuada seguindo a sequência ^{1}SPPGKPQGPPPQGGNQPQGPPPPPGKPQGPPPQGGNKPQGPPPPGKPQGPPPQGGSKSRSA^{61}, conforme está descrita na literatura (Kauffman *et al.* 1991). A síntese foi efectuada num aparelho Applied Biosystems Peptide synthesiser 433^{a} (PE Biosystems, Courtaboueuf, France), usando a estratégia Fmoc, conforme descrito na literatura (Simon *et al.* 2003b).

A resina Fmoc-Ala-NovasynTGA, os aminoácidos N-α-Fmoc protegidos Gly, Ser(tbu), Pro, Arg(Pbf), Asn(trt), Lys(Boc) e Gln(trt), o HOBt e o HBTU provieram da Novabiochem (Läufelfingen, Suiça), os solventes N-metilpirrolidona, piperidina, diclorometano, dimetilformamida (DMF), diisopropiletilamina (DIEA), acido trifluoroacético (TFA) e ácido acético provieram da SDS (Peypin, França).

O sintetizador foi programado usando o método FastMoc-Ω–CondMonPrevPeak fornecido pelo fabricante. Os reagentes utilizados foram os seguintes:

Deprotecção: 100% piperidina;

Capping: anidrido acético/DIEA/HOBt (19ml/9ml/0,8g) em 400 ml de NMP;

Activação: HBTU/HOBt (37,9g/13,6g) em 200ml de DMF;

Acoplamento: 35% de DIEA em NMP;

Lavagem: Diclorometano e NMP;

Utilizaram-se 0.1 mmol de resina e aminoácidos em excesso de 10 vezes em relação à resina.

3.2.1.2 Clivagem da resina

No fim da elongação o péptido é recuperado. A clivagem da resina e a remoção dos grupos protectores das cadeias laterais do péptido IB8c são efectuadas simultaneamente: após lavagem com metanol e diclorometano o péptido foi colocado em TFA/tioanisol/H_2O (95/3/2, v/v/v), numa proporção de 10 ml para cerca de 1,3 g de péptido + resina, e a mistura agitada numa placa de agitação durante 150 minutos. A mistura de péptidos livres e grupos protectores foi separada da resina por filtração em funil de buchner com placa porosa e lavada com TFA/diclorometano (1:9). O produto bruto da síntese foi obtido por precipitação a frio

com éter dietílico e recuperado por filtração. A mistura de péptidos foi dissolvida em água acidulada (com uma gota de TFA) e liofilizada.

3.2.1.3 Purificação do péptido por RP-HPLC

Numa primeira fase o produto bruto da síntese foi analizado num sistema de LC-ESI-MS com um espectrómetro de massa LCQ Advantage (Thermo) acoplado a um módulo de separação Surveyor (Thermo), de modo a optimizar o gradiente.

Os solventes usados foram água com 0,1% de TFA (A) e acetonitrilo com 0,1% de TFA (B), a um fluxo de 0,2 ml/min. Utilizou-se uma coluna analítica da Waters (Delta Pack C18 100 Å, 2x150mm). Estudaram-se diversos gradientes e verificou-se que aquele que permitiu uma melhor separação era o que permitia uma mudança linear de 15 a 20% de B durante um período de 25 minutos.

Foi utilizado um fluxo de gás (N_2) de 80 e um fluxo de gás auxiliar de 20 (unidades arbitrárias), uma voltagem de spray de 4.5 kV, a temperatura do capilar a 270°C e a voltagem do capilar a 10V.

A purificação foi efectuada a uma escala semipreparativa num HPLC da Waters com um detector de absorvância dupla (214 e 254 nm), numa coluna semipreparativa Waters C18 (15 μm, 100 Å, 300x7,8mm d.i.). O gradiente utilizado foi idêntico ao desenvolvido anteriormente para o modo analítico utilizando um fluxo de 3 ml/min. Obteve-se um pico largo e recolheu-se apenas a parte central do pico, identificada por espectrometria de massa como sendo IB8c.

3.2.1.4 Verificação da composição por espectrometria de massa

O produto da síntese e o péptido purificado foram analisados por espectrometria de massa em modo MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption and ionization time of flight) num aparelho Bruker REFLEX III, em modo "reflectron" com uma voltagem de aceleração de 20 kV e uma voltagem de reflector de 23 kV. A matriz usada foi o ácido α-ciano-4-hidroxi-cinamico (da Sigma), preparada como uma solução saturada de 50% de acetonitrilo/0,1% TFA (v/v) em água. O péptido foi misturado nesta solução num ratio 1:1 (v/v) e as amostras foram colocadas num alvo de aço inoxidável (Khemtemourian *et al.* 2006).

3.2.2 Isolamento de α-amilase de saliva humana

A α-amilase foi isolada a partir de saliva humana de acordo com o procedimento descrito na literatura (de Freitas *et al.* 2001). A saliva foi centrifugada a 3500 rpm de modo a remover partículas presentes e de seguida dialisada durante a noite em tampão fosfato (50 mM, pH 6,8). Ao extracto dialisado adicionou-se lentamente sulfato de amónio até se obter uma saturação de 45%, a suspensão foi agitada durante a noite e centrifugada a 20 000 g por 30 minutos. O precipitado foi ressuspendido, dialisado exaustivamente contra água e liofilizado. O produto foi dissolvido em tampão fosfato 50 mM, pH 8,0 e fraccionado numa coluna DEAE Sephadex A50 (17 x 1,6 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi efectuada a um fluxo de 15 ml/h e monitorizada medindo a absorvância a 230 nm de acordo com o método descrito na literatura (de Freitas *et al.* 2001), obtendo-se uma fracção proteica correspondente a α-amilase.

3.3 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do vinho

3.3.1 Concentração de macromoléculas

Cinco litros de vinho branco (Quinta de Bons Ares 2003, Ramos Pinto, Portugal) e 10 L de vinho tinto (Vinha Comprida 2001, Portugal) foram utilizados como fonte de polissacarídeos. Cada um destes vinhos foi evaporado sob pressão reduzida a 35ºC até se obter um volume de 300 ml. A este volume foram adicionados 5 volumes de etanol com 1% de HCl para precipitar as macromoléculas do vinho (1,5 L de etanol + 40 ml de HCl a 37%). Depois de manter a solução a 4ºC por 48 h, decantou-se o sobrenadante, e dissolveu-se o precipitado em água. Esta solução foi extensivamente dialisada contra água, e a diálise foi monitorizada pela medida da condutividade da água (Crison Conductimeter Basic 30). A solução resultante, livre de sais, foi usada para separar os polissacarídeos de vinho.

3.3.2 Separação de polissacarídeos de vinho por cromatografia

A solução dialisada de macromoléculas de vinho foi sujeita a três cromatografias sucessivas de modo a separar os polissacarídeos seguindo o procedimento descrito na literatura (Vernhet *et al.* 1996). A eluição foi seguida medindo o índice de refracção e a absorvância a 254 nm.

As diferentes fracções foram sujeitas a diálises extensivas no final de cada cromatografia, e as diálises foram seguidas medindo a condutividade.

Na Figura 3-1 pode-se ver um esquema representativo do fraccionamento dos polissacarídeos.

Numa primeira fase efectuou-se uma cromatografia de troca aniónica: ajustou-se o pH do concentrado de macromoléculas a 4,8 com tampão acetato (concentração final 50 mM) e injectou-se a solução numa coluna DEAE-Sephacel (15 x 1,6 cm) equilibrada com tampão acetato pH 4,8 a um fluxo de 0,3 ml/min. Obtiveram-se quatro fracções por eluição com 0, 50, 150 e 250 mM de NaCl.

As fracções obtidas pela eluição com 0, 50 e 150 mM de NaCl foram de seguida submetidas a uma cromatografia de afinidade numa coluna de Concanavalina-A (13 x 1,6 cm), a um fluxo de 0,5 ml/min equilibrada com uma solução a pH 7,4 (20 mM tris-HCl), 0,5 M NaCl, 1 mM $MnCl_2$ e 1 mM $CaCl_2$. Esta coluna retém as manoproteínas, deixando passar os polissacarídeos que não contêm manose. A libertação dos compostos retidos foi conseguida pela passagem de uma solução de idêntica composição mas contendo metil-manose.

Cada uma das fracções obtidas foi sujeita a uma última purificação pela passagem numa coluna de exclusão molecular Sephacryl S400-HR (30 x 1,6 cm) sendo a eluição efectuada com tampão acetato 50 mM, pH 5,0, 120 mM NaCl, a um fluxo de 0,8 ml/min.
No final as fracções obtidas foram dialisadas e liofilizadas.

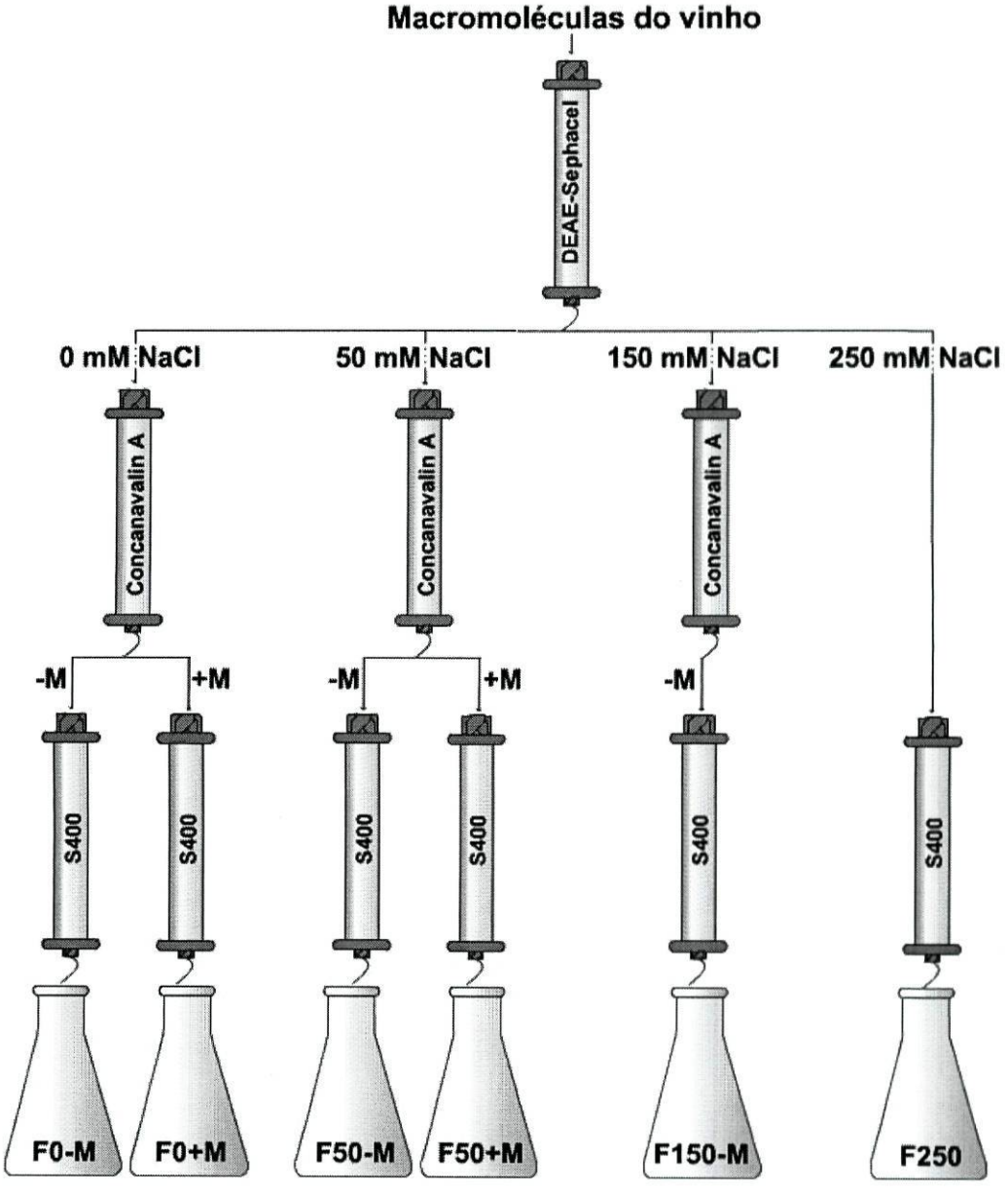


Figura 3-1: Esquema de fraccionamento dos polissacarídeos do vinho. As fracções identificadas com "+M" correspondem a polissacarídeos com manose, eluídos da coluna de concanavalina na presença de metil-manose. Os polissacarídeos identificados com "–M", correspondem a polissacarídeos sem manose que não foram retidos pela coluna de concanavalina. A fracção F250 não foi passada na coluna de concanavalina.

3.3.3 Determinação da composição em resíduos glicosídicos

A composição em termos de resíduos glicosídicos de cada uma das fracções obtidas foi determinada por GC-EI-MS dos derivados trimetilsililo (TMS) dos resíduos metil-glicosídeos, de acordo com o procedimento descrito na literatura (Doco *et al.* 2001).

Os monossacarídeos, tanto os neutros como os acídicos foram libertados sob a forma de metil-glicosídeos após metanólise dos polissacarídeos. A metanólise foi efectuada tratando o polissacarídeo com metanol contendo 0,5 M HCl durante 16 h a 80°C. Após este período evaporou-se à secura usando uma corrente de argon. A conversão dos metil-glicosídeos nos seus derivados trimetilsilil-metil-glicosídeos foi efectuada adicionando 0,3 ml de reagente TriSil® (Pierce Chemical. Co., Rockford, Ill, USA) (hexametildisilizano:trimetilclorosilano:piridina, 2:1:10) e mantendo a solução 30 minutos a 80°C. Os reagentes foram novamente levados à secura usando uma corrente de árgon e os resíduos dissolvidos em hexano (1 ml). Estas soluções foram diluídas 10 vezes e analisadas por GC-EI-MS.

Foram também analisadas amostras de padrões dos seguintes monossacarídeos submetidas ao mesmo tratamento: arabinose, glucose, ácido galacturónico, fucose, manose, ramnose, xilose, ácido glucorónico e galactose. Em todas as injecções foi usado inositol como padrão interno.

A espectrometria de massa foi efectuada num espectrómetro de massa Saturn II (Varian) de impacto electrónico acoplado a um cromatógrafo gasoso Varian 3400 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida RTX-5MS (30m x 0,32 d.i., 1 μm de espessura de filme, da Restek).

O gás de arrastamento utilizado foi o hélio, a um fluxo de 2 ml/min. O injector e a linha de transferência foram utilizados a uma temperatura de 250°C e 220°C, respectivamente. O GC foi programado com gradiente de temperaturas: 120-145°C a 1°C/min, 145-180°C a 0,9°C/min e 180-230°C a 50°C/min. O espectro de massa EI foi adquirido de *m/z* 50-650 a cada 0,6 segundos em modo de monitorização total de iões.

Foram determinadas as rectas de calibração a partir dos gráficos de $A/A_{ino} = f(m/m_{ino})$, para cada um dos monossacarídeos submetidos ao mesmo tratamento das fracções de polissacarideos. A refere-se à área dos picos de cada açúcar, A_{ino} à área do pico do inositol (padrão interno), m à massa que foi injectada de cada açúcar e m_{ino} à massa injectada de inositol.

3.4 Estudos das interacções entre proteínas e taninos por nefelometria

3.4.1 Equipamento

As experiências de nefelometria foram efectuadas num nefelómetro comercial HACH 2100N, equipado com uma lâmpada de filamento de tungsténio com três detectores: um detector de luz dispersa a 90°, um detector de luz dispersa frontal e um detector de luz transmitida.

3.4.2 Reagentes

BSA (fracção V), Pectina de origem cítrica (com 74% de ácido galacturónico com 6,7% dos grupos carboxilo esterificados com metanol), xantano de *Xanthomonas campestris* e ácido poligalacturónico (mínimo 80%) de origem cítrica, todos da Sigma Chemical Co® (St Louis MO, USA); goma arábica de acácia e poliarabinogalactana, ambos da Aldrich Chemical Co® (Dorset, UK); glucose da Pronalab (Portugal), β-ciclodextrina e dextrano de *Leuconostoc* spp. (Mr~40000) da Fluka Chimie® (Buchs, Suíça); manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* da ABAC, Advanced Bioproducts (Schlieren, Suiça).

3.4.3 Interacções proteína-tanino

3.4.3.1 Interacções entre BSA e procianidinas oligoméricas (PCO)

Foram preparadas várias soluções da fracção purificada das procianidinas oligoméricas (PCO) com diferentes concentrações (entre 0,08 e 0,2 $g.L^{-1}$ ou 0,08-0,2 mM considerando um peso molecular médio de 1002 para PCO, Tabela 3-2), num solvente de etanol/água 12% (v/v), 0,1M tampão acetato, pH 5,0, previamente filtrada (filtro de nylon 0,45 μm). 2 ml de cada solução foram colocados em tubos de ensaio e diferentes volumes de uma solução aquosa de BSA (10 $g.L^{-1}$) foram adicionados a cada tubo. A mistura foi agitada (vortex) e deixada em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A formação de turvação foi monitorizada em períodos regulares no nefelómetro durante 60 minutos. Verificou-se que ao fim de cerca 30 minutos a turvação da solução se mantinha constante e adoptou-se 30 minutos como o tempo de espera para atingir o máximo de agregação.

Com base na gama de NTUs obtidos, escolheu-se uma concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ (ou 0,1 mM) de PCO.

2 ml da solução de PCO 0,1 $g.L^{-1}$ foram colocados em vários tubos de ensaio. Em seguida adicionaram-se diferentes volumes (20-220 µl) de uma solução aquosa de BSA (20 $g.L^{-1}$) a cada tubo. A mistura foi agitada (vortex) e deixada em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após 30 minutos mediu-se a turvação em cada um dos tubos.

Deste modo foi possível determinar a quantidade de BSA necessária (0,4 $g.L^{-1}$ ou 6,1 µM) para reagir com as PCO à concentração de 0,1 g.L (0,1 mM) acima estabelecida.

A BSA e as PCO foram preparadas em soluções previamente filtradas (0,45 µm x 47 mm, nylon), e posteriormente centrifugadas a 3500 rpm de modo a garantir que não apresentavam qualquer turvação. Experiências controlo mostraram que na ausência de tanino a BSA não apresentava qualquer turvação e na ausência de BSA a solução de procianidina também não apresentava turvação.

Todos estes ensaios foram realizados em quadruplicado.

3.4.3.2 Influência da força iónica nas interacções entre BSA e PCO

A força iónica da solução de procianidinas (PCO) 0.1 $g.L^{-1}$ (etanol/água 12% v/v, tampão acetato 0,1 M, pH 5,0) foi ajustada com diferentes concentrações de NaCl (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5 M). 2 ml das soluções de PCO com diferentes forças iónicas foram colocados em vários tubos de ensaio e, após um período de espera de 30 minutos, adicionaram-se 80 µl de BSA (10 $g.L^{-1}$), de modo a obter a concentração final de BSA de 6,1 µM estabelecida no ponto anterior (3.4.3.1). A mistura foi agitada (vortex) e colocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após 30 minutos mediu-se a turvação da solução. A BSA e as PCO foram preparadas em soluções previamente filtradas (filtro de nylon de 0,45 µm), e posteriormente centrifugadas a 3500 rpm de modo a garantir que não apresentavam qualquer turvação. Ensaios controlo mostraram que a presença de NaCl não induziu qualquer turvação na solução apenas na presença de BSA (ausência de PCO) ou apenas na solução de PCO (ausência de BSA), o que indica que a turvação resulta da formação de agregados PCO-BSA.

Todos estes ensaios foram realizados em quadruplicado.

3.4.3.3 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e PCO

Foram preparadas várias soluções de PCO 0,1 $g.L^{-1}$ (etanol/água 12% v/v, tampão acetato 0,1 M, pH 5,0) com concentrações crescentes dos seguintes polissacarídeos: dextrano, arabinogalactana, β-ciclodextrina, goma arábica, pectina, ácido poligalacturónico,

manoproteínas e xantano. Testaram-se concentrações de polissacarídeos entre 0 e 50 $g.L^{-1}$ para os polissacarídeos neutros e entre 0 e 0,6 $g.L^{-1}$ para os polissacarídeos iónicos. Também se testaram concentrações crescentes do carboidrato glucose, entre 0 e 275 $g.L^{-1}$. 2 ml das soluções de PCO com diferentes concentrações de carboidrato foram colocados em vários tubos de ensaio e, após um período de espera de 30 minutos, adicionaram-se 80 µl de BSA (10 $g.L^{-1}$) de modo a obter a concentração final de BSA de 6,1 µM estabelecida no ponto 3.4.3.1. A mistura foi agitada (vortex) e guardada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após 30 minutos mediu-se a turvação da solução. A BSA, os carboidratos e as PCO foram preparadas em soluções previamente filtradas (filtro de nylon de 0,45 µm), e posteriormente centrifugadas a 3500 rpm de modo a garantir que não apresentavam qualquer turvação.

Efectuaram-se experiências controlo em que se mediu a turvação de soluções de BSA-polissacarídeo e PCO-polissacarídeo. As soluções de BSA-polissacarídeo não apresentaram qualquer turvação. Nalguns casos, a solução de PCO-polissacarídeo apresentou uma pequena turvação, o que irá ser discutido na Secção 4.2.4. A presença de glucose não induziu qualquer turvação na solução apenas na presença de BSA (ausência de PCO) ou apenas na solução de PCO (ausência de BSA).

Todos estes ensaios foram realizados em quadruplicado.

3.4.3.4 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e vinho

Foi utilizado um vinho tinto Quinta de Bons Ares, 2002 da empresa Adriano Ramos Pinto-Vinhos, S.A.), com 13% de etanol. O vinho foi diluído a 1:50 (etanol/água 12% v/v, tampão acetato 0,1 M, pH 5,0) e foram colocados 2 ml do em vários tubos de ensaio. Adicionaram-se concentrações crescentes de pectina e de manoproteínas e, após um período de espera de 30 minutos, adicionaram-se 80 µl de BSA (10 $g.L^{-1}$), de modo a obter a concentração final de BSA de 6,1 µM estabelecida no ponto 3.4.3.1. A mistura foi agitada (vortex) e guardada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após 30 minutos mediu-se a turvação da solução. A BSA, os polissacarídeos e o vinho foram preparadas em soluções previamente filtradas (filtro de nylon de 0,45 µm), e posteriormente centrifugadas a 3500 rpm de modo a garantir que não apresentavam qualquer turvação.

Efectuaram-se experiências controlo em que se mediu a turvação de soluções de BSA-polissacarídeo e vinho-polissacarídeo. As soluções de BSA-polissacarídeo não apresentaram qualquer turvação. Nalguns casos, a solução de vinho-polissacarídeo apresentou uma pequena turvação e estes valores de referência foram subtraídos ao valor obtido após adição de BSA.

Todos estes ensaios foram realizados em quadruplicado.

3.4.4 Interacção entre proteínas e taninos por nefelometria em contínuo

Desenvolveu-se um sistema que permite a medição em contínuo da luz dispersa por agregados proteína-tanino.

O sistema é composto por uma bomba de gradiente quaternária, uma bomba peristáltica (Gilson), uma câmara de mistura (em acrílico), um reactor (tubo de silicone de 1,5 mm de d.i.), uma célula de detecção de vidro de 10x5 mm d.i. (preparada no laboratório), um nefelómetro de laboratório (HACH 2100N) e um computador equipado com um software de aquisição de dados (ver Figura 4-15, na Secção 4.3.1).

As soluções usadas foram preparadas num solvente de etanol/água 12% (v/v) pH 5,0 (tampão acetato 0,1M) previamente filtrado (filtro de nylon de 0,45 μm). Todas as soluções foram desgaseificadas sob pressão reduzida para evitar que a formação de bolhas interferisse com a análise.

3.4.4.1 Interacções entre BSA e taninos de grainha e de película de uva

Com a ajuda da bomba quaternária foi criando um gradiente crescente de proteína usando duas soluções: solução A, etanol 12% em água (v/v), 0,1M tampão acetato, pH 5,0; solução B, BSA (11 $g.L^{-1}$) em solução A. O fluxo da bomba de gradiente foi de 0,5 $ml.min^{-1}$.

A concentração crescente de proteína foi bombeada para a câmara de mistura onde entrou em contacto com a solução de procianidinas bombeada pela bomba peristáltica a um fluxo constante de 1$ml.min^{-1}$.

Os taninos usados foram as procianidinas oligoméricas (PCO) (0,27 $g.L^{-1}$) e o extracto de película de uva (4,23 $g.L^{-1}$) obtido na Secção 3.1.2, preparadas na solução A.

A mistura reaccional percorreu o reactor, composto por um tubo de silicone de cerca de 3 metros, correspondendo a um tempo de reacção de cerca de 6 minutos, até atingir a célula do nefelómetro onde é medida a intensidade da agregação.

3.4.4.2 Interacções entre BSA e fracções de procianidina de diferentes pesos moleculares

As condições foram idênticas às utilizadas no ponto anterior, mas as procianidinas usadas foram as fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares obtidas na Secção 3.1.1.2, preparadas em solução A.

Foram efectuadas soluções de diferentes concentrações de cada uma destas procianidinas e fizeram-se reagir com concentrações crescentes de BSA. Escolheu-se a concentração de procianidina que originava valores de NTU não superiores a 20 no ponto de máxima agregação com BSA. Adoptou-se a concentração de 0,33g.L^{-1} (5 μM) para a BSA.

3.4.4.3 Efeito da concentração de polissacarídeos na interacção entre procianidinas e BSA

Na bomba quaternária foi introduzida uma terceira solução de modo a poder criar um gradiente crescente de polissacarídeo, fixando a concentração de proteína: solução A, etanol 12% em água (v/v), 0,1 M tampão acetato, pH 5,0; solução B, BSA (11 g.L^{-1}) em solução A; solução C, polissacarídeo (dextrano, goma arábica ou xantano) em solução A.

A concentração de BSA foi mantida constante (9% de solução B, correspondente a 0,33 g.L^{-1} ou 0,5 μM). A concentração crescente de polissacarídeo foi criada diminuindo progressivamente a percentagem de solução A e aumentando a percentagem de solução C.

A mistura da solução de proteína e de polissacarídeo formada na bomba quaternária é bombeada a um fluxo de 0,5 ml.min^{-1} para a câmara de mistura onde entra em contacto com a solução de procianidinas bombeada pela bomba peristáltica a um fluxo constante de 1ml.min^{-1}.

Foram utilizadas as fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares (obtidas na Secção 3.1.1.2) preparadas em solução A.

3.4.4.4 Efeito da concentração de etanol na interacção entre procianidinas e BSA

Com a bomba de gradiente formou-se um gradiente crescente de etanol, usando para isso três soluções: solução A, água (0% etanol), 0,1 M tampão acetato, pH 5,0; solução B, BSA (11 g.L^{-1}) em solução A; solução C, etanol 30 % em água (v/v), 0,1 M tampão acetato, pH 5,0.

A concentração de BSA foi mantida constante (5% de solução B, correspondente a 0,18 $g.L^{-1}$ de BSA). A concentração de etanol foi criada diminuindo progressivamente a percentagem de A e aumentando a percentagem de C.

A mistura da solução de proteína e de etanol formada na bomba quaternária é bombeada a um fluxo de 0,5 $ml.min^{-1}$ para a câmara de mistura onde entra em contacto com a solução de procianidinas bombeada pela bomba peristáltica a um fluxo constante de $1ml.min^{-1}$.

As procianidinas utilizadas correspondem a Fracção II (PM médio = 870) (obtidas na Secção 3.1.1.2) e foram preparadas em solução A a uma concentração de 0,15 $g.L^{-1}$.

3.4.4.5 Interacções entre BSA e taninos do vinho

O vinho utilizado é um vinho do Porto (20% de etanol) de 2000 (da empresa Adriano Ramos Pinto, Vinhos S.A.), com dois anos.

Com a bomba quaternária foi gerado um gradiente crescente de proteína usando duas soluções: solução A, etanol 12% em água (v/v), 0,1M tampão acetato, pH 5,0; solução B, BSA (11 $g.L^{-1}$) em solução A. O fluxo originado pela bomba quaternária foi de 2,7 $ml.min^{-1}$, escolhido de modo a permitir obter resultados não superiores a 20 NTUs.

A concentração crescente de proteína foi bombeada para a câmara de mistura onde entrou em contacto com o vinho bombeada pela bomba peristáltica a um fluxo constante. Foram testados vários fluxos de vinho entre 0,1 e 0,36 $ml.min^{-1}$.

3.4.4.6 Interacções entre BSA e taninos em vinhos enriquecidos com procianidinas

O vinho utilizado é um vinho do Porto de 1998 (da empresa Adriano Ramos Pinto, Vinhos S.A.), com cinco anos (20% de etanol). A este vinho foram adicionadas diferentes quantidades de procianidinas oligoméricas extraídas de grainhas de uva (extracto semelhante ao obtido na Secção 3.1.1) em concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $g.L^{-1}$.

Cada um destes vinhos foi analisado utilizando condições semelhantes às da Secção anterior, mas o fluxo de vinho adoptado foi de 0,07 $ml.min^{-1}$.

3.5 Estudos das interacções entre proteínas e taninos utilizando um fluorímetro como aparelho de medição da dispersão da luz

3.5.1 Equipamento

Utilizou-se um fluorímetro Perkin Elmer LS 45 como medidor da luz dispersa a 90°. Ambos os monocromadores, de excitação e de emissão, foram colocados a um comprimento de onda de 400 nm ao qual as proteínas, taninos e polissacarídeos usados praticamente não absorvem a luz incidente.

A formação de agregados proteína-tanino foi medida através da medição da luz dispersa por esses agregados.

3.5.2 Reagentes utilizados

Foram preparadas soluções "stock" em 12% etanol/água (v/v) de:

- Procianidinas (fracção IV) a 1,25 $g.L^{-1}$
- IB8c a 0,10 $g.L^{-1}$
- α-amilase a 0,44 $g.L^{-1}$
- Tampão acetato a 0,10 M e pH 5,0
- NaCl a 0,50 M
- Fracções de polissacarídeos isolados do vinho (1 a 5,0 $g.L^{-1}$)
- Goma arábica a 2,0 $g.L^{-1}$

Todas as soluções, excepto as de proteínas e polissacarídeos, foram cuidadosamente filtradas através de filtros de nylon (0,45 μm). As soluções de proteínas e polissacarídeos foram filtradas através de filtros de acetato de celulose (0,45 μm).

Efectuaram-se experiências controlo com as soluções de proteína, de polifenol e de polissacarídeos e verificou-se que não há diferenças significativas entre a luz dispersa por estas soluções e a luz dispersa por uma solução de 12% etanol.

3.5.3 Estudos sobre a concentração de α-amilase e procianidinas

Fizeram-se experiências preliminares com diversas concentrações de proteína e tanino (procianidinas, Fracção IV) até obter as melhores condições de análise.

3.5.3.1 Determinação da concentração de procianidina

Prepararam-se diversos tubos de plástico de 2 ml com 4 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV) e 16 µl de solução "stock" de tampão acetato (para fixar o pH a 5,0). A cada um destes tubos adicionaram-se diferentes volumes (de 2 a 128 µl) de solução stock de α-amilase. A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 15,6 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 5,0 mM (pH 5,0), e de 12% de etanol. Os tubos foram agitados num vortex e deixados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este tempo as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

3.5.3.2 Determinação da concentração de α-amilase

Prepararam-se diversos tubos nas mesmas condições descritas no ponto anterior (3.5.3.1), fixando a concentração da α-amilase (22,0 $mg.L^{-1}$), aos quais foram adicionados diferentes volumes da solução "stock" de procianidina (Fracção IV), de modo a obter concentrações finais entre 7,80 e 63,0 $mg.L^{-1}$.

Os tubos foram agitados num vortex e deixados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este tempo as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida. Entre cada medição a célula foi lavada com uma solução 12% etanol e passada pela solução a ser medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

3.5.4 Estudos sobre a concentração de IB8c e procianidinas

Foram feitas as mesmas experiências com a proteína IB8c, utilizando diferentes concentrações de proteína e tanino: testou-se uma concentração fixa de procianidina (fracção IV) de 31,2 $mg.L^{-1}$ com IB8c em concentrações entre 0,6 e 5,0 $mg.L^{-1}$ e, inversamente, testou-se uma concentração de 3,12 $mg.L^{-1}$ para a IB8c variando a concentração de procianidinas entre 19,5 e 46,8 $mg.L^{-1}$. Após 30 minutos as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

3.5.5 *Efeito dos polissacarídeos do vinho nas interacções entre proteína e tanino*

O efeito dos polissacarídeos foi testado adicionando diferentes volumes (0-32 µl) de cada uma das soluções stock de polissacarídeo aos microtubos contendo tanino, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0 e 12% etanol.

No caso das experiências com α-amilase os polissacarídeos foram adicionados a tubos contendo: 4 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 10 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0). A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 15,6 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 3,1 mM (pH 5,0) e de 12% de etanol. Após uma espera de 30 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 16 µl de solução stock de α-amilase, de modo a obter uma concentração de α-amilase de 22,0 $mg.L^{-1}$.

No caso das experiências com IB8c, os polissacarídeos foram adicionados a tubos contendo: 8 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 10 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0). A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 31,2 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 3,1 mM (pH 5,0) e de 12% de etanol. Após uma espera de 30 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 10 µl de solução stock de IB8c de modo a obter uma concentração de IB8c de 3,12 $mg.L^{-1}$.

Após 30 minutos as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

O pH foi verificado e confirmou-se que não foi alterado pela adição dos polissacarídeos.

3.5.6 Efeito da força iónica nas interacções entre proteínas e procianidinas

O efeito da força iónica na formação de agregados entre ambas as proteínas (IB8c e α-amilase) e a Fracção IV das procianidinas foi testado adicionando diferentes volumes (0-258 µl) da solução stock de NaCl a diversos microtubos.

A estes microtubos foram também adicionadas, no caso das experiências com α-amilase: 4 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 10 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0) e 16 µl de solução stock de α-amilase. A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 15,6 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 5,0 mM (pH 5,0), de α-amilase de 22,0 $mg.L^{-1}$, de 12% de etanol, e de NaCl entre 0 e 400 mM.

No caso das experiências com IB8c, foram adicionados a cada tubo 8 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 10 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0) e 10 µl de solução stock de IB8c. A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 31,2 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 5,0 mM (pH 5,0), de IB8c de 3,12 $mg.L^{-1}$ e de 12% de etanol.

Após 30 minutos as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

3.5.6.1 Influência da força iónica no efeito dos polissacarídeos sobre as interacções entre proteína e tanino

O efeito dos polissacarídeos foi testado a uma força iónica superior à testada na Secção 3.5.5 de modo a comparar as duas forças iónicas.

Na Secção 3.5.5 a força iónica usada foi de 2,0 mM, correspondendo a uma concentração de tampão de 3,1 mM.

O efeito dos polissacarídeos foi também estudado a uma força iónica de 12,4 mM. Para o efeito adicionaram-se diferentes volumes (0-32 µl) das soluções stock de cada polissacarídeo aos microtubos contendo tanino, tampão acetato 5 mM, pH 5,0, NaCl 9,3 mM, e 12% etanol.

No caso das experiências com α-amilase os polissacarídeos foram adicionados a tubos contendo: 4 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 16 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0) e 6 µl de solução stock de NaCl. A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 15,6 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 5,0 mM (pH 5,0), de NaCl 9,3 mM e de 12% de etanol. A força iónica desta solução corresponde a 12,4 mM. Após uma espera de 30 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 16 µl de solução stock de α-amilase, de modo a obter uma concentração de α-amilase de 22,0 $mg.L^{-1}$.

No caso das experiências com IB8c, os polissacarídeos foram adicionados a tubos contendo: 8 µl de solução stock de procianidinas (Fracção IV), 16 µl de solução stock de tampão acetato (pH 5,0) e 6 µl de solução stock de NaCl. A cada tubo foram adicionados diferentes volumes de solução 12% etanol, de modo a obter um volume final de 320 µl, correspondente a uma concentração de tanino de 31,2 $mg.L^{-1}$, de tampão acetato de 5,0 mM (pH 5,0), de NaCl 9,3 mM e de 12% de etanol. A força iónica desta solução corresponde a 12,4 mM. Após uma espera de 30 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 10 µl de IB8c de modo a obter uma concentração de IB8c de 3,12 $mg.L^{-1}$.

Após 30 minutos as soluções foram agitadas e transferidas para a célula do fluorímetro, onde a intensidade da luz dispersa pelos agregados foi medida.

Cada uma destas experiências foi preparada em pelo menos triplicado e os resultados apresentados em média ± desvio padrão.

4 RESULTADOS

PARTE I

4.1 Síntese, isolamento e caracterização de IB8c e polissacarídeos

4.1.1 Resumo

Nesta primeira parte vai-se descrever a síntese de uma PRP salivar e o isolamento, purificação e caracterização dos polissacarídeos do vinho que servirão como substratos "modelo" para o estudo das interacções entre taninos e proteínas associados ao fenómeno da adstringência.

4.1.2 Síntese de um péptido salivar da família das PRPs

Dentro da grande diversidade de proteínas existentes na saliva humana foram escolhidas proteínas existentes na saliva da parótida, que é a saliva maioritária em situações estimuladas, e que será por isso mais importante na sensação de adstringência.

A α-amilase, que constitui 30% da saliva da parótida, foi isolada da saliva humana e, como representante das PRPs, que constituem os restantes 70%, decidiu-se sintetizar quimicamente uma PRP básica. Dentro das PRPs básicas existe uma grande variedade de proteínas, que podem variar também entre diferentes indivíduos, dado que nem todas as PRPs são expressas em todos os indivíduos. Optou-se por sintetizar a proteína IB8c, visto que pode ser encontrada em diversos indivíduos (Messana *et al.* 2004) e, por outro lado, contém um padrão repetitivo nos resíduos 1-54 que é recorrente em outras PRPs básicas da saliva humana (Ver Figura 1-20). A esta característica acrescem vantagens de ordem prática em relação à síntese química: é um péptido com um tamanho conveniente (péptidos muito grandes, com tamanho superior a 70 aminoácidos levam a uma diminuição no rendimento da síntese) e não coloca problemas na sua sequência de aminoácidos, tais como por exemplo a IB7 que tem uma sequência Asp-Asn propícia à formação de aspartimida (Simon *et al.* 2003b).

4.1.2.1 Síntese peptídica em fase sólida de uma PRP básica, a IB8c

Na síntese peptídica em fase sólida usa-se uma resina como suporte insolúvel para a construção de uma cadeia peptídica. A resina é inerte aos reagentes utilizados, o que permite que a síntese seja automatizada. A separação durante a síntese de péptidos intermédios presentes dos reagentes solúveis pode ser efectuada simplesmente através de operações de filtração e lavagem. Podem-se utilizar reagentes em excesso que são eliminados por lavagem sem que ocorram perdas importantes do péptido em construção já que o péptido permanece ligado ao suporte sólido ao longo de toda a síntese. A síntese é efectuada do sentido C para o N-terminal, pela fixação de cada aminoácido constituinte da cadeia peptídica (Figura 4-1).

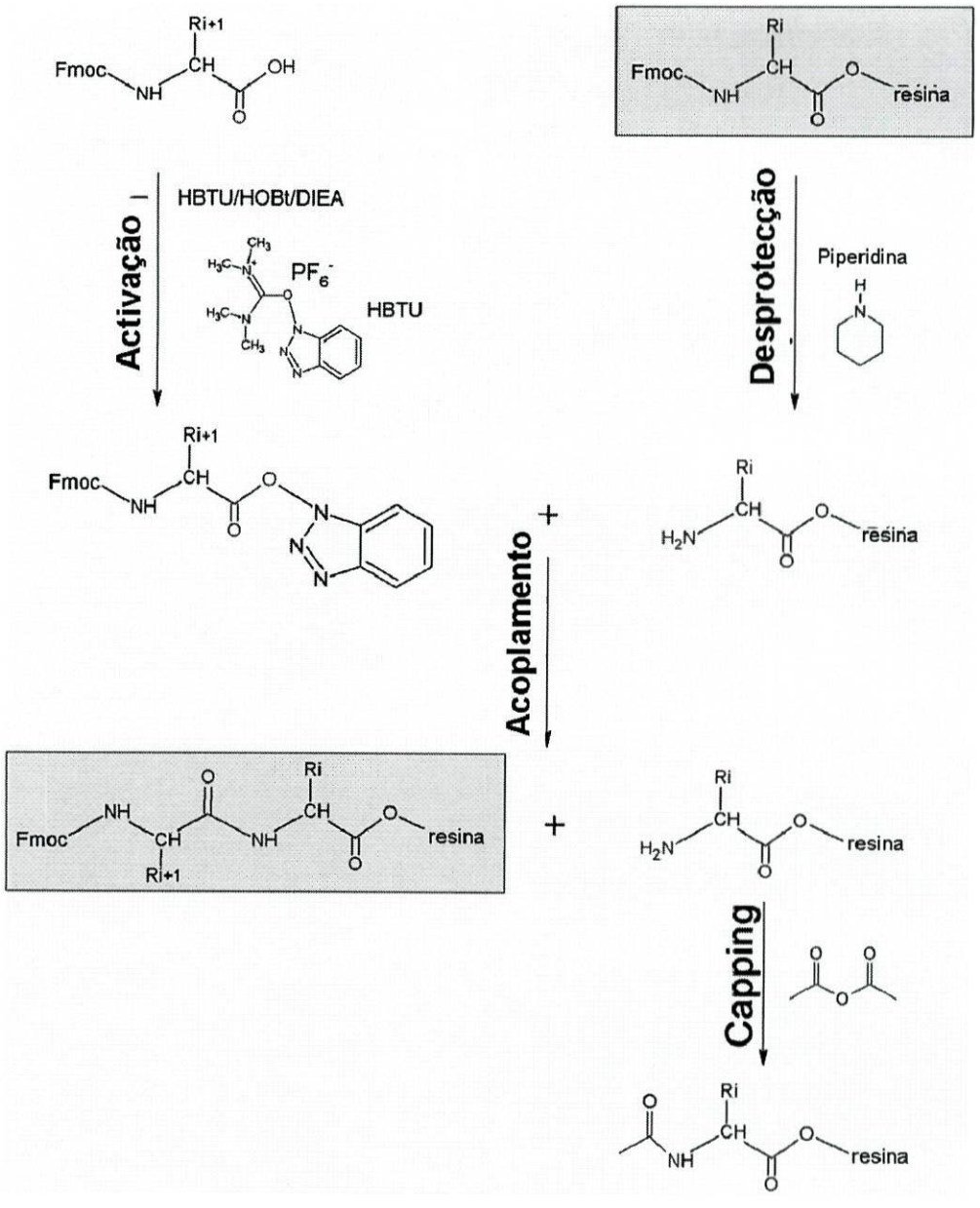


Figura 4-1: Esquema da síntese em fase sólida usando a estratégia FastMoc

O resíduo C-terminal encontra-se ligado ao suporte sólido (resina) pelo grupo carboxilo. Todos os grupos funcionais nas cadeias laterais dos aminoácidos estão protegidos com grupos protectores permanentes que não são afectados pelas condições da reacção empregues na síntese. O grupo protector temporário que protege o grupo α-amino ligado à resina é removido (deprotecção). Um excesso de um segundo aminoácido é introduzido após o seu grupo carboxilo ter sido activado para formar ligações amida (activação). Após o acoplamento, os reagentes em excesso são removidos por lavagem. O ciclo re-inicia-se pela remoção do grupo protector N-terminal do dipéptido e pela adição de um terceiro aminoácido. O processo repete-se até o péptido pretendido se encontrar completo.

No caso especifico da estratégia Fmoc, as etapas são as seguintes:

Deprotecção: retira o grupo Fmoc do aminoácido, a começar pelo primeiro que já vem carregado na resina, de modo a deixar uma extremidade α-amina livre. Isto é efectuado usando piperidina;

Activação: o aminoácido seguinte, ainda com o grupo Fmoc n-terminal é activado por uma solução de HOBt/HBTU;

Acoplamento: o ester activado forma uma ligação amida com o resíduo desprotegido. Um dos problemas que se pode encontrar durante o acoplamento é a formação de ligações hidrogénio intrapeptídicas que levariam à formação de agregados que dificultariam o acesso do aminoácido livre ao aminoácido desprotegido. No entanto, usando uma base (DIEA) em N-metilpirrolidona (acoplamento anidro) pode-se evitar este problema;

Capping: Se o acoplamento não funcionar com alguns resíduos, estes podem reagir com resíduos posteriores causando delecções no meio da cadeia peptídica. A fim de o evitar bloqueiam-se todas as funções amina que não reagiram através de um tratamento com anidrido acético.

Após a síntese se encontrar completa a remoção do péptido da resina bem como a desprotecção das cadeias laterais é efectuada usando TFA.

Efectuaram-se 3 sínteses em que se obtiverem cerca de 400 mg de produto bruto em cada síntese.

O espectro MALDI-TOF do produto da síntese do IB8c pode ser visto na Figura 4-2. Como se pode ver existe uma grande contaminação de péptidos truncados. Os péptidos truncados são péptidos em que um dos acoplamentos não funcionou, e em que se bloquearam as funções amina que não reagiram através de um tratamento com anidrido acético (o capping), pelo que os péptidos apresentam menos aminoácidos do que o péptido final (IB8c-X).

Esta é uma das desvantagens da síntese em fase sólida, em que há uma acumulação de produtos secundários derivados de reacções secundárias ou de reacções incompletas, que acumulam na resina contaminando o produto final e que, por serem muito semelhantes ao péptido pretendido, se tornam extremamente difíceis de separar deste.

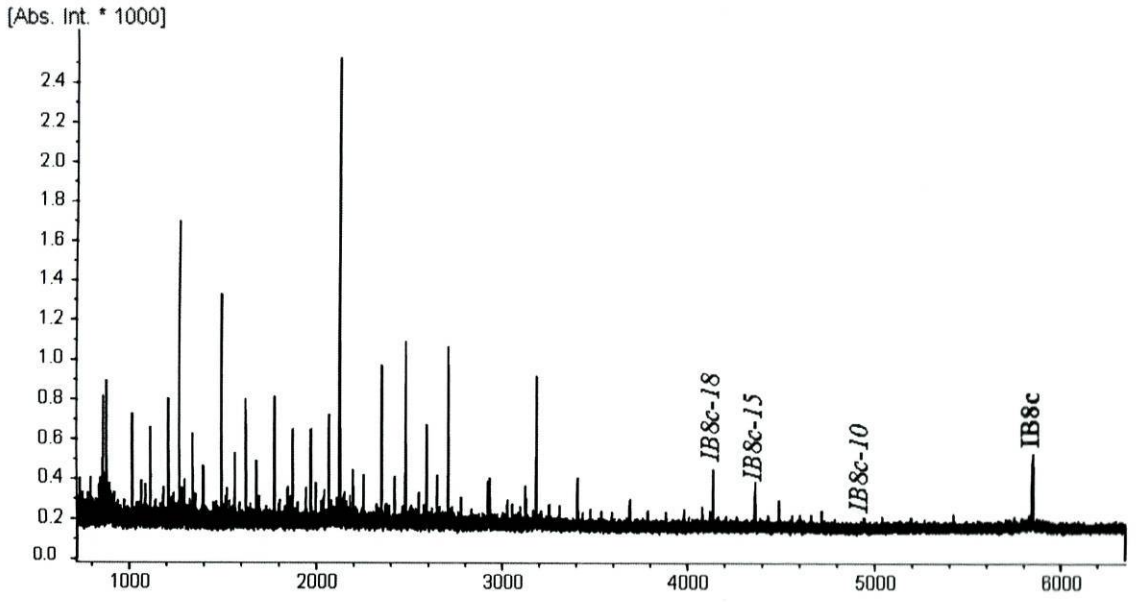


Figura 4-2: Espectro MALDI-TOF do produto da síntese peptídica do IB8c. O pico marcado como IB8c corresponde à espécie $[M+H]^{1+}$ e os restantes picos correspondem a péptidos truncados. Alguns picos foram marcados como IB8c-X, em que "X" representa o número de aminoácidos em falta.

4.1.2.2 Isolamento de IB8c

A separação do péptido IB8c das impurezas foi realizada utilizando HPLC em fase reversa. Numa primeira fase estudou-se o perfil cromatográfico e optimizou-se o gradiente de separação num sistema analítico com detecção por ESI-MS.

Após diversas tentativas com diferentes gradientes, obteve-se um gradiente que permitiu eluir o péptido IB8c, não numa forma pura, mas separado de uma grande parte das impurezas. Na Figura 4-3 pode-se observar que existe uma grande quantidade de compostos na mistura reaccional total da síntese. O péptido desejado, IB8c, é eluído aos 35 minutos. Neste pico também são eluídos outros péptidos truncados.

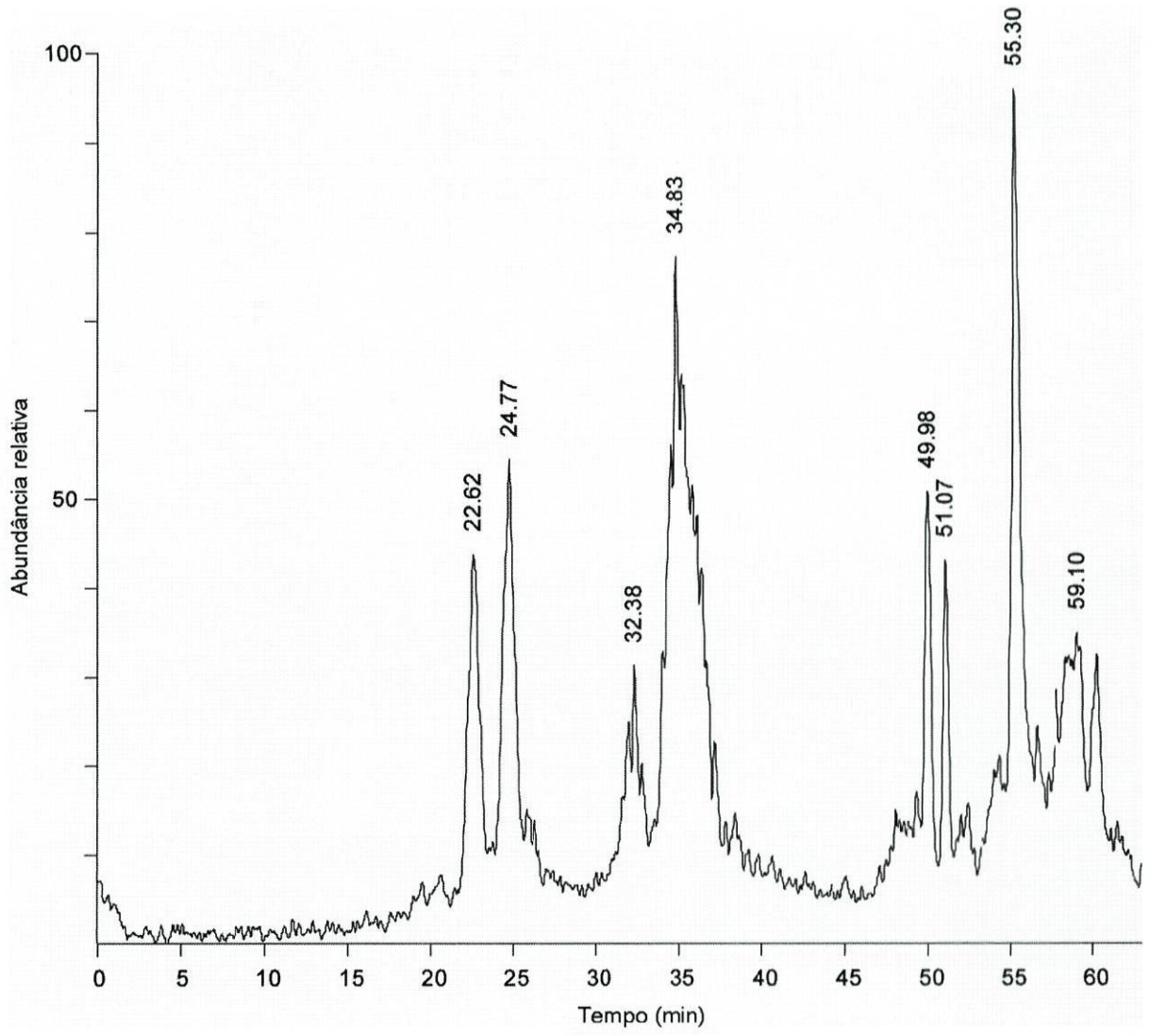


Figura 4-3: Cromatograma de LC-ESI-MS da mistura reaccional (produto bruto) da síntese de IB8c. O péptido IB8c é eluído aos 35 minutos juntamente com alguns péptidos truncados.

Adaptando este gradiente a um método semi-preparativo, em que se injecta uma maior quantidade de produto e em que o fluxo é superior, verificou-se que o péptido IB8c elui num pico largo. Foram feitas muitas injecções consecutivas em que se recolheu apenas a parte central deste pico. A composição desta fracção foi analisada por espectrometria de massa (MALDI-Tof). O espectro obtido pode ser visto na Figura 4-4. A purificação permitiu obter um produto enriquecido em IB8c, com algumas contaminações de péptidos truncados co-eluídos com IB8c. Estas contaminações poderão não ser muito importantes nos estudos que se seguem dado que os fragmentos são muito similares a IB8c. Por esta razão e atendendo às dificuldades da síntese, optou-se por não se tentar nova purificação.

Obtiveram-se 58,9 mg deste péptido após purificação, de um total de 3 sínteses, o que demonstra a dificuldade desta síntese.

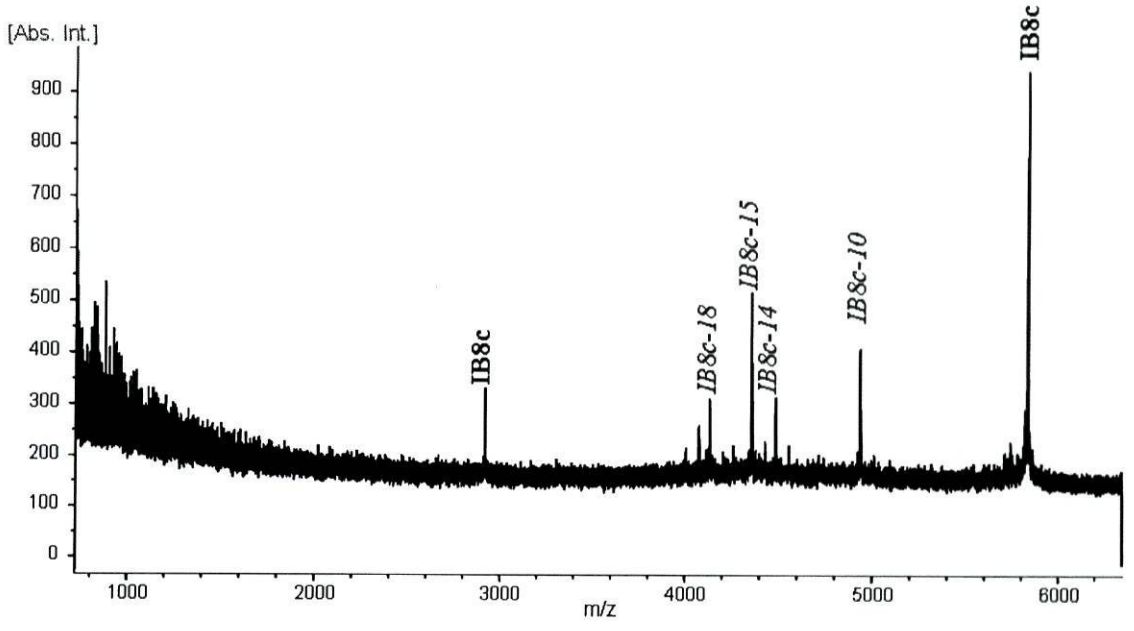


Figura 4-4: Espectro MALDI-TOF do péptido IB8c após purificação. Os picos marcados como IB8c correspondem às espécies $[M+H]^{1+}$ e $[M+2H]^{2+}$, e os picos marcados como IB8c-X representam os péptidos truncados, em que "X" representa o número de aminoácidos em falta.

4.1.3 Polissacarídeos do vinho

4.1.3.1 Isolamento e purificação dos polissacarídeos

O isolamento de polissacarídeos começou por ser efectuado num vinho tinto. No entanto, devido a dificuldades na purificação não se conseguiram obter AGPs e RGII. De modo a poder isolar estes polissacarídeos foi seleccionado um vinho branco de modo a evitar problemas causados pela grande quantidade de pigmentos presentes nos vinhos tintos, que danificavam muito rapidamente os géis cromatográficos utilizados para a purificação.

O uso de diversas técnicas de cromatografia (troca iónica, afinidade e exclusão molecular) tem sido amplamente usado para a separação de polissacarídeos do vinho (Pellerin *et al.* 1995; Pellerin *et al.* 1996; Vidal *et al.* 2003).

Neste trabalho seguiu-se o procedimento descrito por Vernhet *et al.* (1996) que se baseia numa primeira separação dos polissacarídeos com base na sua densidade de cargas negativas, seguida de uma separação das manoproteínas por cromatografia de afinidade e uma purificação final por cromatografia de exclusão molecular, conforme o esquema apresentado na Secção experimental (Figura 3-1).

Na primeira fase eluiram-se 4 fracções da coluna troca iónica. As três primeiras foram passadas na coluna de concanavalina, originando três fracções que não ficaram retidas (F0-M, F50-M e F150-M). As fracções que ficaram retidas na coluna de concanavalina foram F0+M e F50+M. A F250 não foi passada na coluna de concanavalina por não conter manose. Cada uma destas fracções foi posteriormente purificada numa coluna de exclusão molecular. As quantidades obtidas de cada uma das 6 fracções obtidas são referidas na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Quantidades (mg/L_{vinho}) de cada uma das fracções de polissacarídeos obtidas por cromatografia a partir de 10 L de vinho tinto e 5 L de vinho branco.

	F0-M	F50-M	F150-M	F250	F0+M	F50+M
Vinho Tinto (mg/L)	-	-	-	-	0,81	1,81
Vinho Branco (mg/L)	5,4	0,8	10,8	12,2	-	-

As quantidades obtidas dos polissacarídeos parecem pequenas relativamente às quantidades de polissacarídeos presentes em vinhos (que podem rondar os 20-50 mg por litro de vinho branco no caso de RGII mas que podem chegar aos 150 mg por litro de vinho tinto, no caso das AGPs) (ver Secção 1.4.5.4). No entanto, os baixos valores obtidos poderão ser explicados por perdas devidas à grande quantidade de passos (precipitação, cromatografias, diálises) necessários à purificação de cada uma destas fracções.

4.1.3.2 Caracterização das fracções de polissacarídeos em termos da sua composição em resíduos glicosídicos

A composição das fracções foi determinada por espectrometria de massa após metanólise e derivatização com TMS de acordo com o método descrito na literatura (Doco *et al.* 2001). Este procedimento permite a determinação simultânea de resíduos acídicos e neutros dos açúcares constituintes dos polissacarídeos.

O tratamento dos polissacarídeos com metanol anidro contendo HCl liberta os derivados metil-glicosídeos dos monossacarídeos que constituem os polissacarídeos, que foram seguidamente convertidos nos respectivos derivados trimetilsililados. Para cada resíduo de açúcar libertado podem-se formar várias estruturas devido a processos de anomerização e isomerização, correspondentes na sua maioria a derivados das formas α–, β-, furanose e piranose. Em alguns casos, como por exemplo no caso da arabinose podem-se ver os 4 picos separados correspondentes a α-furanose, β-piranose, α-piranose e β-furanose (picos 7, 8, 9 e 12, respectivamente, na Figura 4-5B). Noutros casos estes picos encontram-se juntos (como é o caso do pico 26 da mesma figura, em que os derivados α-piranose e β-furanose da galactose co-eluem). Por outro lado, nalguns cromatogramas apenas se observa um pico de um dado monossacarídeo (como é o caso do pico 13, correspondente ao derivado α-piranose da fucose, que se pode ver na Figura 4-6), porque os restantes picos estão em menor concentração e não são detectados.

Os espectros de massa dos monossacarídeos pertencentes a uma dada classe (pentoses, hexoses, deoxihexoses, etc.) são similares e não podem ser utilizados para os diferenciar (por exemplo, não se pode diferenciar manose de glucose com base no espectro de massa). No entanto, cada monossacarídeo apresenta um cromatograma distinto, já que as proporções relativas dos diferentes anómeros (α e β) e formas cíclicas (piranose e furanose), bem como os respectivos tempos de retenção em colunas de cromatografia gasosa são característicos de cada monossacarídeo. Assim, a identificação dos monossacarídeos para os quais havia padrões disponíveis comercialmente foi feita por comparação com os respectivos padrões.

Com base na análise do perfil cromatográfico das fracções F0-M, F50-M, F150-M, F0+M e F50+M, foram identificados os monossacarídeos constituintes de cada uma destas fracções. Na Figura 4-5 podem-se observar, como exemplos, os cromatogramas de uma fracção de um polissacarídeo retido em concanavalina (A: F0+M) e de uma fracção de um polissacarídeo não retido em concanavalina (B: F50-M).

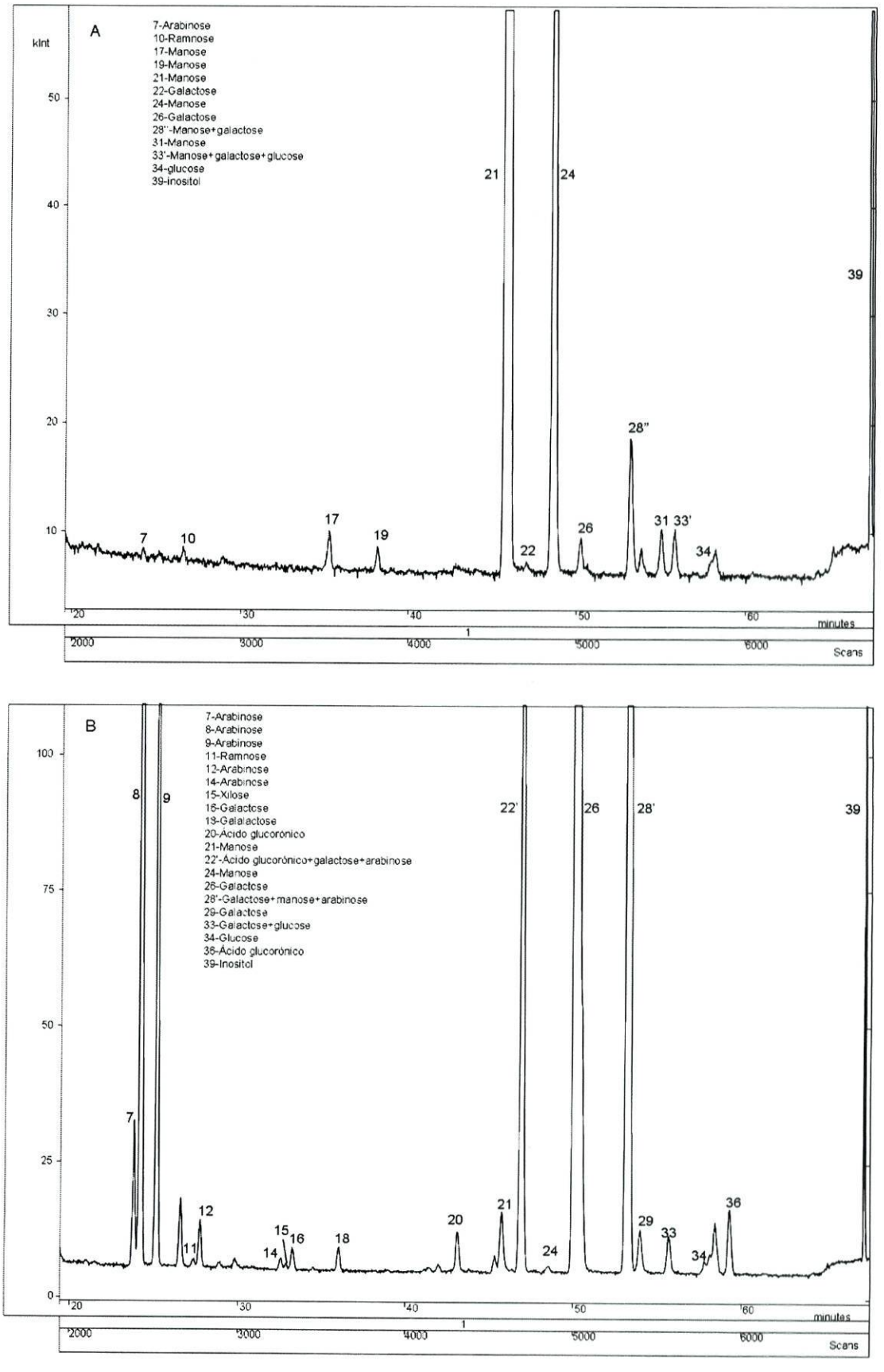


Figura 4-5: Cromatogramas (GC-EI-MS) dos derivados TMS metil-glicosídeos obtidos após metanólise e derivatização da fracção de polissacarídeos F0+M (A) e F50-M (B). Os números em cada pico identificam os monossacarídeos.

Conforme seria de esperar, a fracção de polissacarídeo F0+M, que foi retida pela coluna de concanavalina é extremamente rico em manose (picos 21 e 24 da Figura 4-5 A), contendo apenas pequenas quantidades de outros monossacarídeos.

A fracção de polissacarídeo F50-M, que não foi retida pela coluna de concanavalina (Figura 4-5 B) é rico em arabinose e galactose (picos 7, 8, 9, 26), com alguma quantidade de alguns outros monossacarídeos.

No entanto, existem alguns monossacarídeos para os quais não existem padrões disponíveis comercialmente, tais como o acido acérico, Dha, Kdo, metil-fucose ou a apiose, típicos do RGII. O perfil cromatográfico correspondente ao polissacarídeo eluído na fracção F250 (Figura 4-6) revelou a presença de picos cromatográficos que não correspondiam aos padrões de monossacarídeos utilizados. Nestes casos, os monossacarídeos foram apenas identificados com base nos iões específicos destes compostos e pelo padrão de fragmentação descrito na literatura (Doco *et al.* 2001), e esta fracção foi identificada como correspondente ao polissacarídeo RGII.

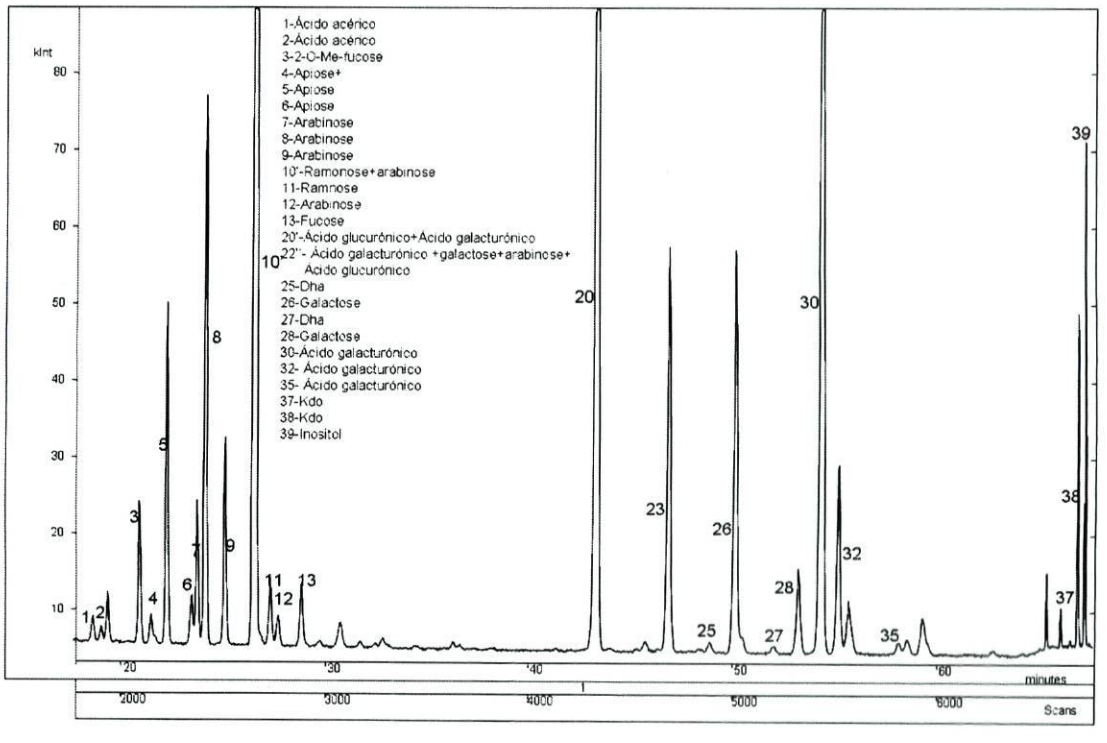


Figura 4-6: Cromatograma (GC-EI-MS) dos derivados TMS metil-glicosídeos gerados após metanólise e derivatização da fracção de polissacarídeos F250.

A Tabela 4-2 identifica os monossacarídeos presentes nas fracções de polissacarídeos isolados dos vinhos e a sua composição. Os resultados obtidos revelaram alguma variabilidade, apresentando valores de desvio padrão elevados. No entanto, o objectivo desta análise dos

monossacarídeos do vinho era a de identificar a presença de monossacarídeos típicos de cada uma das fracções, e não a sua quantificação exacta. Essa quantificação e uma caracterização extensiva dos polissacarídeos do vinho podem ser encontrada na literatura (Pellerin *et al.* 1992; Pellerin *et al.* 1995; Pellerin *et al.* 1996; Vernhet *et al.* 1996; Doco *et al.* 2001; Coimbra *et al.* 2002; Vidal *et al.* 2003).

Tabela 4-2: Composição de monossacarídeos (percentagem em massa) das fracções de polissacarídeos isoladas do vinho.

	F0-M	F50-M	F150-M	F250	F0+M	F50+M
Arabinose	23 ± 11	18 ± 3	21 ± 6	9 ± 2	1,3 ± 1,2	1,5 ± 0,2
Galactose	54 ± 14	74 ± 12	66 ± 5	6 ± 1	0,1 ± 0,02	1,2 ± 0,4
Manose	10 ± 4	1,5 ± 0,9	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,4	98 ± 7	93 ± 13
Ramnose	0,2 ± 0,4	-	1,9 ± 0,7	11 ± 3	0,9 ± 0,8	1,0 ± 0,1
GlcA	0,9 ± 0,1	2,0 ± 0,7	2,6 ± 0,4	2 ± 1	-	-
Xilose	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	-	-
Glucose	11 ± 5	-	-	-	-	-
GalA	-	-	0,2 ± 0,1	53 ± 6	-	-
Fucose	-	-	-	1,0 ± 0,1	-	-
AceA	-	-	-	5 ± 2	-	-
2-O-Me-fuc	-	-	-	1,1 ± 0,1	-	-
Apiose	-	-	-	2,0 ± 0,2	-	-
Kdo	-	-	-	5,2 ± 0,6	-	-
Dha	-	-	-	4 ± 1	-	-
Polissacarídeo	***AGP0***	***AGP50***	***AGP150***	***RGII***	***MP0***	***MP50***

GlcA: Ácido glucurónico, GalA: acido galacturónico, AceA: ácido acérico, 2-O-Me Fuc: 2-O-Metil fucose, Kdo: ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octulosónico, Dha: ácido 3-desoxi-D-*lixo*-2-heptulosárico

Tendo a conta a composição em monossacarídeos de cada fracção, classificaram-se então os polissacarídeos obtidos, como AGPs, RGII ou MP e numeraram-se de acordo com a sua ordem de saída da coluna de troca aniónica.

Assim, e conforme já foi mencionado, a fracção F250 foi denominada de RGII dado que mostrou a presença dos açúcares diagnóstico deste polissacarídeo.

As fracções eluídas com 0, 50 e 150 mM de NaCl da coluna de troca iónica e que não foram retidas pela coluna de concanavalina mostraram conter predominantemente arabinose, galactose e ácido glucurónico, bem como pequenas quantidades de xilose e ramnose. Esta é a composição típica das AGPs e por esta razão estas fracções foram identificadas como AGP0, AGP50 e AGP150 respectivamente. Nestes polissacarídeos o ácido glucurónico mostrou ser o ácido urónico predominante sendo que apenas a fracção com maior quantidade de ramnose

mostrou conter acido galacturónico, o que se encontra de acordo com outros estudos (Pellerin *et al.* 1995; Vidal *et al.* 2003). A composição de cada fracção reflecte a ordem de saída da coluna de troca iónica dado que se verifica um aumento de ácidos urónicos nas fracções AGP0 a AGP150.

Nas fracções que ficaram retidas na coluna de concanavalina (F0+M e F50+M), verificou-se que os picos mais abundantes eram de manose, pelo que estas fracções correspondem a manoproteínas (MP0 e MP50, respectivamente). Estas fracções contêm uma elevada proporção de manose (> de 90% dos resíduos glicosídicos). A ordem de saída destas duas fracções da coluna de troca iónica não pode ser explicada pela sua composição em monossacarídeos (dado que apenas mostrou conter açúcares neutros). No entanto, Vernhet *et al.* (1996) mostraram que a carga das manoproteínas estava relacionada com o seu teor de fosfato, e não com o seu teor de açúcares.

A presença de pequenas percentagens de açúcares que não deviam entrar na composição dos polissacarídeos correspondentes a cada fracção, tal como a presença de glucose e manose na fracção AGP0 e de arabinose, ramnose e galactose nas fracções das MPs pode ser devida à adsorção de pequenas quantidades de polissacarídeo contaminante nas colunas, como foi também verificado por outros autores (Gonçalves *et al.* 2002).

PARTE II

4.2 Estudo das interacções entre proteínas e taninos por nefelometria em "*batch*"

4.2.1 Condições experimentais

As experiências nestes estudos foram todas efectuadas em 12% etanol e a pH 5,0. O pH de 5 foi escolhido dado que existem estudos (de Freitas *et al.* 2002) que evidenciam que tanto a BSA como as proteínas salivares interagem fortemente com taninos condensados a este pH. Por outro lado, sabe-se que o pH salivar baixa com a ingestão de bebidas acídicas e o grau de acidez resultante depende do volume ingerido, do poder tamponante da saliva e do modo de beber (Johansson *et al.* 2004), pelo que o pH de 5 parece ser um pH adequado, intermédio entre o pH da saliva (~7) e o pH de bebidas acídicas ricas em polifenóis, tais como o vinho (~3,4)

Por sua vez, a concentração de etanol na boca durante a ingestão de um vinho pode variar com o fluxo salivar, com o volume ingerido e com o conteúdo inicial de etanol do vinho, pelo que uma concentração de 12% (v/v) foi escolhida dado ser muito utilizada em estudos modelo.

4.2.2 Influência da concentração de BSA na interacção com PCO

Tal como foi discutido na Secção 1.3.2, sabe-se que as interacções proteína-tanino são influenciadas pelas concentrações relativas de proteína e tanino.

A concentração de proteína e de tanino correspondente ao máximo de interacção destes componentes e ao máximo de agregação é definida neste trabalho como concentração estequiométrica.

Neste sentido, foram efectuados estudos com diferentes concentrações de proteína e tanino, de modo a determinar as concentrações estequiométricas de BSA e tanino.

Numa primeira fase foram realizadas experiências preliminares com o extracto de procianidinas de grainha de uva obtido na Secção 3.1.1. No entanto, os estudos nefelométricos da interacção da BSA com este extracto mostraram resultados muito variáveis. Por este motivo decidiu-se eliminar as procianidinas de menor peso molecular, menos reactivas (monómeros de catequina e epicatequina) e as procianidinas mais polimerizadas, muito reactivas (de peso molecular superior a 1600) deste extracto bruto, que poderiam estar na origem desta variabilidade. O extracto resultante corresponde a uma mistura de procianidinas oligoméricas (PCO) com um peso molecular médio de 1002.

Foram feitos estudos sobre as interacções de diversas concentrações de PCO (0,08-0,2 mM) com a BSA. O objectivo desta fase era determinar a concentração de procianidina necessária para obter valores de turvação da solução não superiores a 20 NTU após agregação com a

BSA. Nestas condições, a quantidade de agregados é suficientemente pequena para que a absorção da luz incidente seja desprezável e a intensidade da luz dispersa é proporcional à concentração dos agregados em solução (Chapon 1993).

Assim, foi seleccionada uma concentração baixa de tanino (0,1 mM), para a qual o valor de turvação era dessa ordem de grandeza. Usando esta concentração, procedeu-se ao estudo da influência da concentração de BSA na formação de agregados de proteína-tanino (Figura 4-7). Pode-se ver que a formação de agregados BSA-tanino aumentou com aumento da concentração de BSA até um máximo. A partir deste ponto a adição de mais BSA levou a uma diminuição na formação de agregados.

Este fenómeno, tal como já foi discutido na Secção 1.3.2, foi observado em diversos estudos por outros autores. Luck *et al.* (1994) verificaram que a PGG na presença de gelatina forma um precipitado, que se redissolve com a adição de mais gelatina. Outros estudos, com extractos de taninos condensados de canola, mostraram que na presença de excesso de BSA existe menor precipitação de complexos proteína-tanino (Naczk *et al.* 1996). No caso da gelatina e do ácido tânico verificou-se um aumento de turvação com aumento de concentração de proteína até um ponto, a partir do qual um posterior aumento de concentração de proteína leva a um declínio na turvação (Siebert *et al.* 1996). Num outro estudo Siebert *et al.* (2000) verificaram no caso da gliadina e do ácido tânico que o tamanho das partículas varia com a variação do ratio proteína-tanino.

O modelo conceptual proposto por Siebert (1996; 1999), mencionado na Secção 1.3.2, pode explicar os comportamentos verificados neste trabalho e descritos por outros autores: considerando que a BSA tem um número fixo de locais de ligação ao polifenol (PCO), e este tem um número fixo de locais de ligação à proteína, na concentração à qual o número de locais de ligação entre os dois compostos é equivalente forma-se uma grande rede de ligações cruzadas, correspondente ao ponto máximo de agregação e à maior turvação da solução. Concentrações e quantidades relativas diferentes desta resultariam em agregados de menores dimensões e consequentemente numa menor dispersão de luz (Figura 4-7).

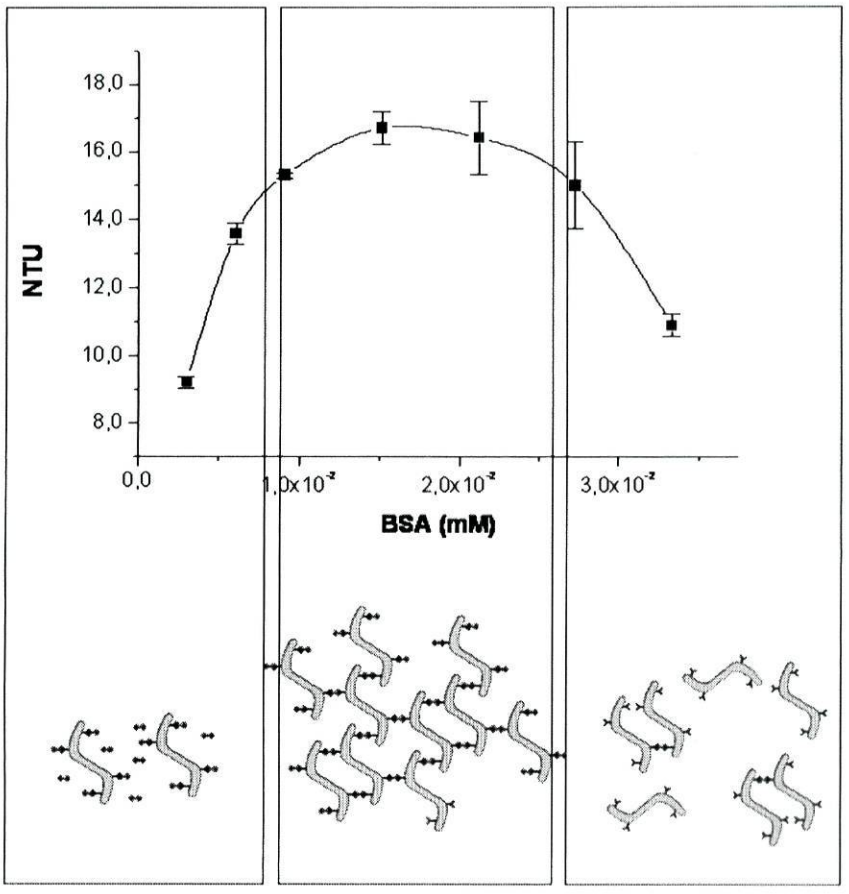


Figura 4-7: Influência da concentração de BSA na formação de agregados com procianidinas oligoméricas (PCO a 0,1 mM) em etanol 12% (v/v), tampão acetato 0,1 M a pH 5,0. Na parte inferior pode-se ver o esquema de interacção entre BSA e PCO de acordo com o modelo conceptual de Siebert (1996; 1999). Os "Esses" cinza correspondem a proteínas com um número fixo de locais de ligação a polifenóis, a preto estão representados os polifenóis com locais de ligação a proteínas.

O gráfico da Figura 4-7 permite estimar a estequiometria do complexo proteína-tanino correspondente ao ponto de máxima turvação usando as concentrações relativas de cada componente. O máximo de turvação foi atingido quando a concentração de tanino era 6,6 vezes superior à de BSA, indicando um ratio molar de polifenol:BSA perto de 7:1.

Nas experiências seguintes optou-se por usar uma quantidade de BSA ligeiramente inferior á estequiométrica de modo a assegurar uma complexação total da proteína por parte do polifenol.

4.2.3 Influência da força iónica na interacção entre BSA e PCO

Estudou-se a influência da força iónica na interacção entre a BSA e as procianidinas oligoméricas a pH 5,0 (Figura 4-8).

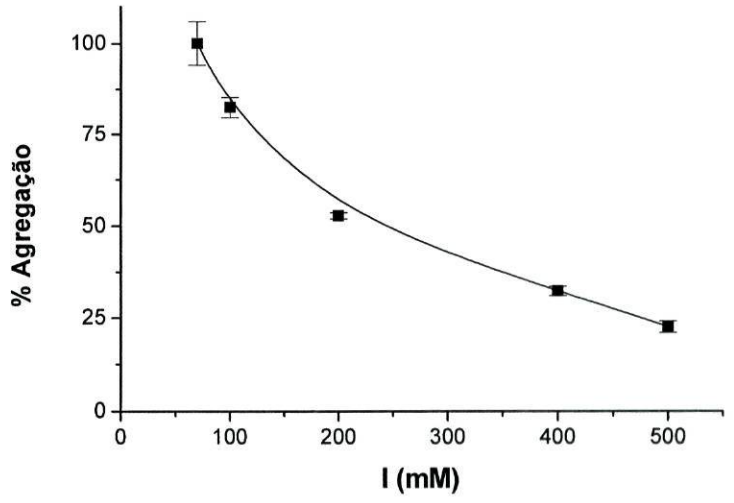


Figura 4-8: Influência da força iónica na formação de agregados entre BSA (6,1 μM) e procianidinas oligoméricas (PCO, 0,10 mM) em solução aquosa 12% etanol, 0,1M tampão acetato e pH 5,0.

A força iónica foi alterada de 70 (correspondente à força iónica originada apenas pelo tampão) até 500 mM pela adição de diferentes quantidades de cloreto de sódio. A turvação decresceu regularmente com o aumento na força iónica. As interacções proteína tanino parecem ser muito sensíveis à força iónica já que se verifica uma descida de 80% na agregação quando a força iónica aumenta de 70 para 500 mM.

Decidiu-se verificar se este efeito se mantinha para concentrações de proteína muito inferiores à estequiométrica. Na Figura 4-9 pode-se observar a turvação causada por PCO-BSA a uma concentração idêntica à anterior (6,1 μM) e a uma concentração quatro vezes inferior (1,5 μM), a duas forças iónicas distintas: 70 e 1000 mM. De facto o efeito da força iónica parece ser semelhante a ambas as concentrações de proteína levando a uma marcada descida dos valores de turvação.

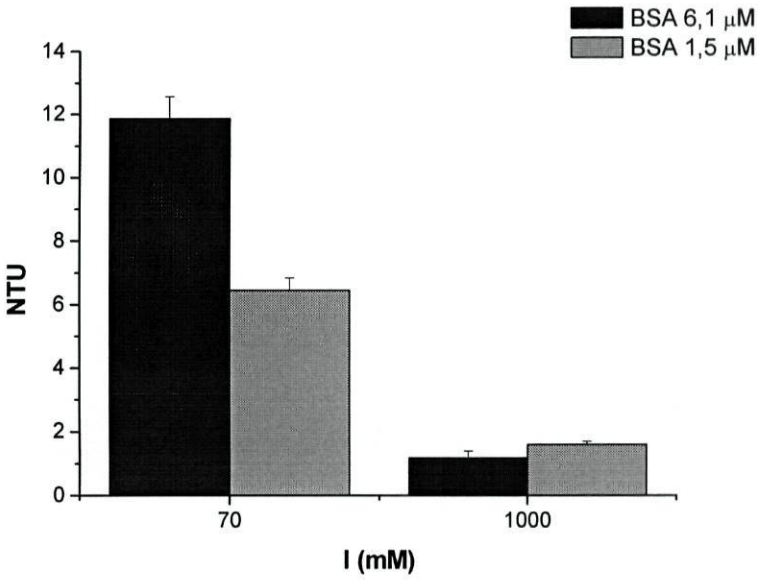


Figura 4-9: Influência da força iónica na formação de agregados entre BSA a duas concentrações distintas (6,1 e 1,5 μM) e procianidinas oligoméricas (PCO a 0,10 mM) em solução aquosa 12% etanol, 0,1M tampão acetato, pH 5,0.

Os resultados aqui obtidos parecem indicar que as interacções entre proteína e tanino são de facto muito afectados pela presença de iões em solução. A diminuição da afinidade pode ser explicada pela adsorção de iões à superfície do tanino, dificultando a interacção com proteínas, ou à adsorção à superfície do complexo proteína-tanino levando a uma maior solvatação. Alternativamente, e tal como recentemente foi verificado por Rawel (2005), é possível que a presença de sal em solução leve a uma mudança da estrutura da BSA que pode levar a uma alteração da exposição de alguns resíduos de aminoácidos e a uma diminuição da interacção com os polifenóis. De facto também estes autores verificaram uma diminuição da interacção entre a quercetina e a BSA com o aumento de força iónica.

Outros resultados da literatura parecem contrariar os resultados obtidos, como já foi discutido na Secção 1.3.3.4. Diversos estudos relatam um aumento de precipitação de complexos proteína-tanino com o aumento da força iónica (Oh *et al.* 1980; Luck *et al.* 1994; Kawamoto *et al.* 1997b). No entanto, estes resultados foram obtidos em sistemas de PGG-BSA (Luck *et al.* 1994; Kawamoto *et al.* 1997b) ou de procianidinas-gelatina, que são sistemas mais hidrofóbicos. De facto estes autores sugerem que as interacções hidrofóbicas podem ser aumentadas na presença de sal devido a um efeito de "salting-out" que aumenta a precipitação.

Conforme já foi referido, as interacções proteína-tanino dependem muito de vários factores (estrutura das proteínas e taninos, pHs, solventes, temperatura, presença de outras substâncias, etc.), o que pode explicar os diferentes resultados obtidos com modelos diferentes.

4.2.4 Influência dos polissacarídeos na interacção entre BSA e procianidinas oligoméricas

O efeito de diversos polissacarídeos e da glucose na agregação entre as procianidinas oligoméricas e a BSA foi avaliado medindo a variação na turvação da solução com o aumento da concentração de carboidrato (Figura 4-10). Fizeram-se diversos ensaios, com concentrações crescentes de carboidrato até ao ponto em que não se verificaram mais alterações na turvação da solução.

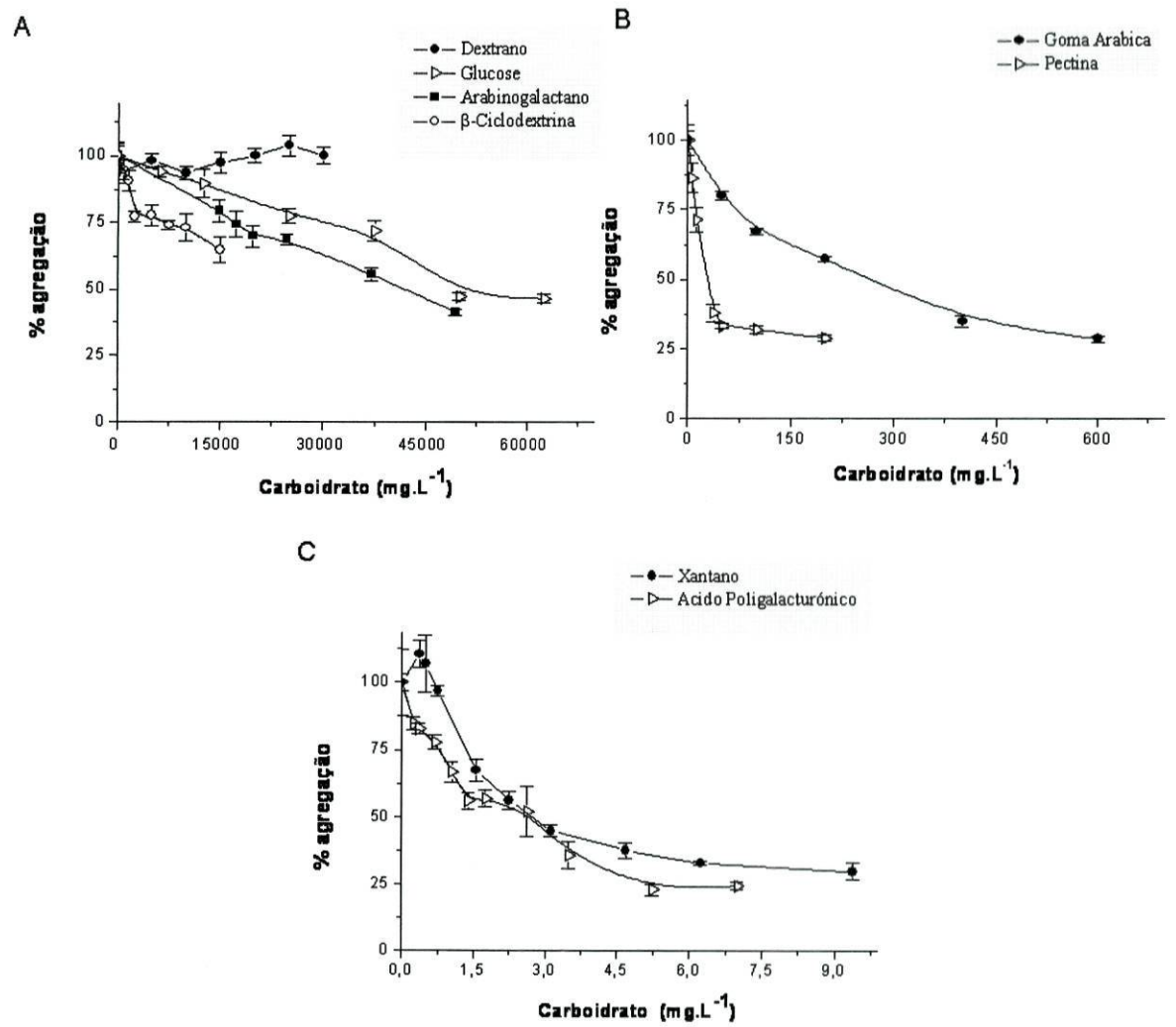


Figura 4-10: Influência da concentração de carboidratos na formação de agregados entre BSA (6,1 μM) e PCO (0,10 mM) em solução aquosa com etanol a 12%, tampão acetato 0,1 M e pH 5,0.

O delineante experimental, nomeadamente a preparação das soluções e a ordem pela qual os vários compostos são postos em contacto, obedecem à sequência que ocorre durante a degustação de um alimento. Ou seja, os polissacarídeos e os taninos que se encontram nos alimentos, quando são ingeridos entram em contacto simultaneamente com as proteínas salivares. Assim, prepararam-se soluções de polissacarídeo e tanino às quais se adicionaram posteriormente as diferentes proteínas.

Efectuaram-se experiências com cada um dos polissacarídeos com diversas concentrações crescentes até determinar a gama de concentrações em que se observa um decréscimo gradual da agregação, e, quando possível, um mínimo de agregação. No caso do arabinogalactana e da ciclodextrina não se conseguiu atingir este mínimo de agregação por questões de solubilidade do polissacarídeo. O dextrano não mostrou qualquer efeito inibidor mesmo a concentrações superiores às indicadas na Figura 4-10.

A glucose atingiu um mínimo de agregação apenas para concentrações da ordem dos 200 $g.L^{-1}$ como pode ser visto na Figura 4-11.

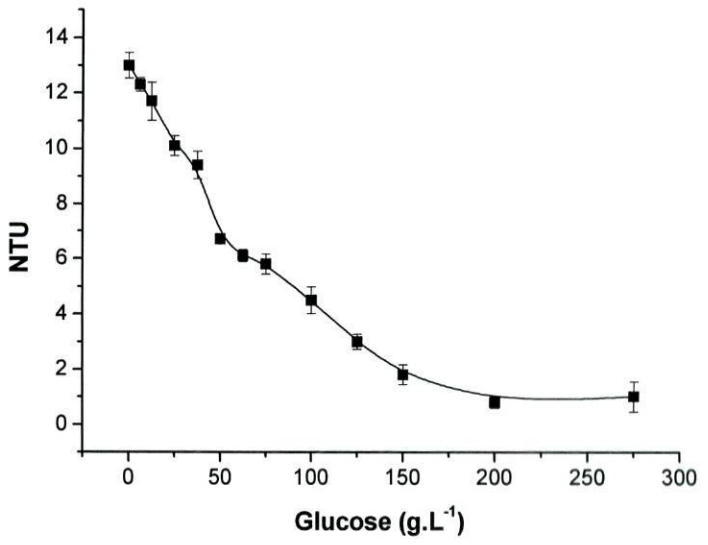


Figura 4-11: Influência da concentração de glucose na formação de agregados entre BSA (6,1 μM) e PCO (0,10 mM) em solução aquosa com etanol a 12%, tampão acetato 0,1 M e pH 5,0.

Quando se tentou solubilizar o ácido poligalacturónico (APG) na solução tampão (solução aquosa com etanol a 12%, tampão acetato 0,1 M pH 5,0), verificou-se que o polissacarídeo não solubilizava, possivelmente devido ao etanol ou aos sais do tampão. Optou-se por dissolver este composto em água e adicionar o etanol posteriormente de modo a obter uma solução 12% etanol, sem acertar o pH. Deste modo foi possível solubilizar o APG. Preparou-se uma solução concentrada de modo a adicionar volumes pequenos em relação ao volume da

mistura final (200 µl/2ml), garantindo que as condições experimentais (pH e força iónica) se mantinham idênticas às dos restantes ensaios.

Foram efectuadas experiências controlo em que se mediu a turvação originada das soluções de proteína-polissacarídeo e PCO-polissacarídeo. No geral não se observou qualquer turvação acima do valor originado pela solução tampão (0,5 NTU), o que significa que a turvação da solução após a adição da BSA resulta da formação de agregados PCO-BSA. No entanto, nos casos da pectina, da arabinogalactana, do dextrano e da ciclodextrina, e apenas para as concentrações mais elevadas destes polissacarídeos, observou-se alguma turvação da solução PCO-polissacarídeo. Estes valores, apesar de serem baixos (da ordem do 1-2 NTU), foram subtraídos aos obtidos após a adição de proteína para suprimir esta interferência.

Os resultados da Figura 4-10 são mostrados em percentagem dos NTUs medidos de modo a poder comparar mais facilmente o efeito dos vários polissacarídeos: O valor de NTU apresentado pela solução contendo apenas proteína e tanino foi considerada como sendo 100%, valores inferiores a 100% indicam uma menor intensidade de luz dispersa indicando uma inibição da agregação.

No geral, a presença de polissacarídeos levou a uma diminuição da agregação (Figura 4-10). A única excepção foi observada no caso do dextrano em que a agregação se manteve constante ou aumentou ligeiramente para as concentrações superiores.

O dextrano é um polímero neutro de glucose ligada por ligações 1→6, com várias cadeias laterais, mas em que, em média, cerca de 95% da glucose encontra-se na cadeia principal (Belitz *et al.* 1987). Este polissacarídeo não inibe a formação de agregados proteína-tanino, possivelmente devido a efeitos estereoquímicos que limitam o número de locais de ligação aos polifenóis. O pequeno aumento da percentagem de agregação poderia dever-se a um aumento do tamanho do agregado, resultante da adsorção de algumas moléculas de dextrano.

A concentração dos açúcares neutros, como sejam a glucose, a β-ciclodextrina e a arabinogalactana, necessária para inibir a agregação de proteína e tanino é muito superior à dos outros polissacarídeos estudados, com um carácter iónico.

Outros autores já tinham verificado a inibição da interacção entre proteína e tanino por parte de diferentes carboidratos (Ozawa *et al.* 1987; Luck *et al.* 1994), e esta já foi discutida na Introdução (Secção 1.4.5.2).

No geral, a percentagem de agregação diminui linearmente com a adição de carboidratos para os valores de concentrações mais baixos, e o valor do seu declive pode ser definido como

"Constante de inibição de agregação" (K_{AI}) e é expresso em NTU por unidade de concentração de carboidrato ($mg.L^{-1}$) (Tabela 4-3).

A Tabela 4-3 mostra o valor desta constante para os vários carboidratos estudados. Pode-se observar que a constante de inibição de agregação (K_{AI}) dos açúcares neutros e de menor peso molecular é muito inferior à dos restantes açúcares de carácter iónico.

Tabela 4-3: Constantes de inibição de agregação (K_{AI}) entre BSA e PCO para vários carboidratos neutros e iónicos.

	K_{AI} $(NTU/mg.L^{-1})$	R^2
Carboidratos neutros		
Glucose	0,77	0,98
Arabinogalactana	1,5	1,00
β-ciclodextrina	5,9	0,99
Carboidratos iónicos		
Goma arábica	329	0,98
Pectina	1 610	0,98
Xantano	30 219	0,98
Ácido poligalacturónico	24 225	0,94

É de supor que a associação dos carboidratos de menor peso molecular, como a glucose e a β-ciclodextrina, seja primariamente um efeito de ligação superficial, resultando de ligações hidrogénio entre os grupos hidroxilo destes carboidratos e dos polifenóis. Estes carboidratos são demasiado pequenos para efectuar ligações com polifenóis de um modo suficientemente eficaz para evitar a associação entre os polifenóis e as proteínas. Para valores de concentração relativamente elevados, as moléculas de carboidrato adsorvem à superfície dos taninos e dos complexos de proteína-tanino aumentando o seu carácter hidrofílico e a solvatação do complexo formado.

A β-ciclodextrina é um polissacarídeo cíclico composto por 7 moléculas de glucose ligadas por ligações 1→4. Tem a forma de um "donut" sendo a cavidade de natureza hidrofóbica com a capacidade de sequestrar substratos no seu interior (Haslam 1998) (Figura 1-25, na Secção 1.4.5.2). No entanto, esta capacidade não parece ser muito efectiva no encapsulamento das procianidinas usadas neste estudo, provavelmente devido ao seu tamanho molecular relativamente elevado (PM médio de 1002).

A K_{AI} dos polissacarídeos iónicos tais como a goma arábica, a pectina, o xantano e o ácido poligalacturónico é muito superior à dos carboidratos neutros. A goma arábica e a pectina são menos eficientes na inibição da agregação que o xantano e o ácido poligalacturónico que têm um carácter mais iónico.

A goma arábica é um polissacarídeo complexo, cuja cadeia principal consiste de unidades de galactose ligadas por ligações 1→3. As cadeias laterais são compostas por duas a 5 unidades de galactose ligadas entre si por ligações 1→3, e ligadas à cadeia principal por ligações 1→6. Tanto a cadeia principal como as cadeias laterais contêm arabinose, ramnose e ácido glucurónico, pelo que a goma arábica é considerada como um polissacarídeo neutro ou levemente acídico (Belitz *et al.* 1987; Verbeken *et al.* 2003). Isto poderia explicar o valor mais baixo de K_{AI} relativamente aos outros polissacarídeos iónicos.

O ácido poligalacturónico é um polissacarídeo iónico dado que é um polímero de ácido galacturónico, assim como a pectina, que é composta de unidades de ácido galacturónico ligados por ligações 1→4, com a presença de alguma quantidade de ramnose (Belitz *et al.* 1987). No entanto, no caso da pectina uma percentagem dos grupos carboxilo dos ácidos galacturónicos da cadeia principal encontra-se esterificada com metanol, o que lhe diminui a polaridade, daí a sua menor eficiência para inibir a agregação comparativamente ao ácido poligalacturónico (menor K_{AI}).

O xantano é uma heteroglicana constituída por glucose, manose e ácido glucurónico. A molécula consiste numa cadeia principal de glucose ligada por ligações do tipo 1→4, mas em que cada resíduo alternado contém uma cadeia lateral trissacarídea ligada na posição 3. A cadeia lateral é composta por manose-(1→4)-ácido glucurónico-(1→2)-manose. A cadeia lateral é muito carregada dado que os resíduos de manose terminais podem conter o cetal de piruvato ligado nas posições 4 e 6 e os resíduos internos de manose podem encontrar-se acetilados na posição 6 (Ver Figura 1-26) (Belitz *et al.* 1987).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Luck *et al.* (1994) que observaram uma maior inibição por parte de polissacarídeos com carácter mais iónico. Os possíveis mecanismos propostos para a inibição da agregação estão ilustrados na Figura 4-12. Um dos possíveis mecanismos (i) é a formação de um complexo ternário de proteína-tanino-polissacarídeo que devido às características hidrofílicas dos carboidratos leva a uma maior

solvatação e a uma menor agregação. A observação de que os polissacarídeos com maior capacidade de inibir a agregação são polielectrólitos contendo grupos carregados que facilitariam a solvatação, está de acordo com este mecanismo.

Para além do carácter iónico, outra característica dos polissacarídeos que pode justificar as diferenças de comportamento entre eles, poderá ser a capacidade de formar estruturas em solução capazes de encapsular polifenóis (mecanismo ii, Figura 4-12), tal como foi proposto por Ozawa *et al.* e Haslam (1987; 1998). Tal como foi discutido na Introdução (Secção 1.4.5.3), um dos polissacarídeos que está descrito apresentar esta característica é o xantano que forma um gel fraco com a capacidade de suportar partículas em suspensão. Os poros formados pela rede ordenada do xantano em solução poderiam ter a capacidade de incorporar taninos de peso molecular relativamente baixo (Haslam 1998) (ver Figura 1-27).

A pequena subida na percentagem de agregação observada na Figura 4-10 para concentrações baixas de xantano poderia ser explicada por um aumento do tamanho do agregado causado pela adsorção de moléculas de xantano, que no entanto não seriam em número suficiente para solvatar os complexos de proteína-tanino. Alternativamente, para esta gama de concentração (0-0,7 $mg.L^{-1}$), é possível que o número de moléculas de xantano em solução não seja suficiente para formar uma rede capaz de encapsular os polifenóis.

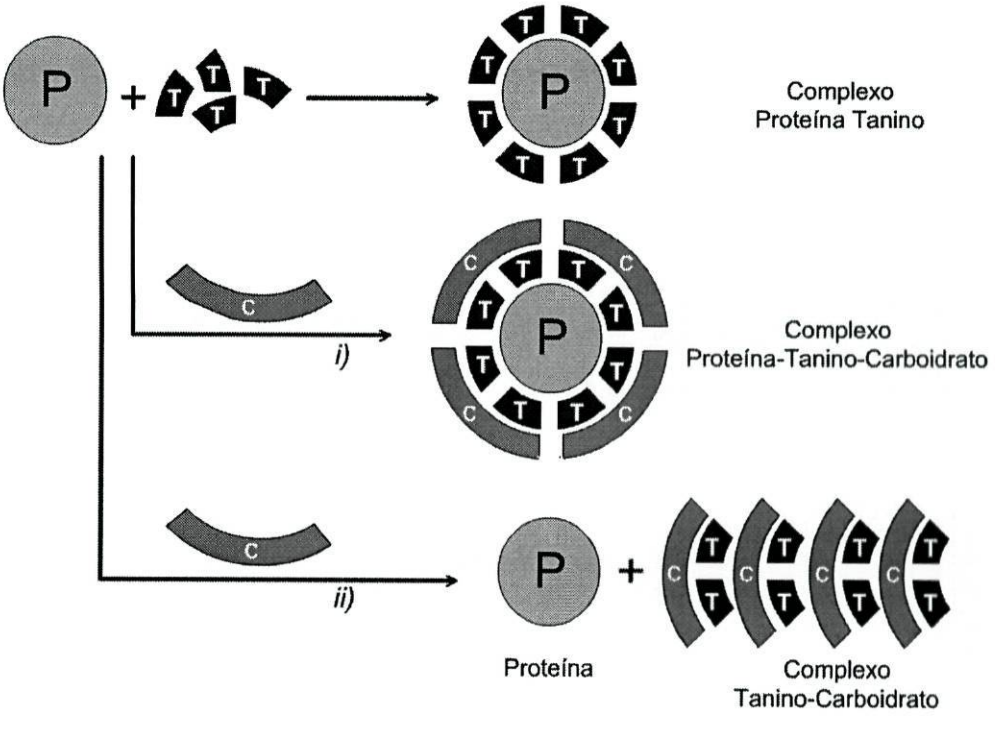


Figura 4-12: Esquema que ilustra os mecanismos que estão possivelmente envolvidos na inibição da agregação entre proteínas e taninos pelos carboidratos. P: proteína, T: tanino, C: carboidrato.

4.2.5 Influência de manoproteínas e pectinas nas interacções de BSA com taninos do vinho e PCO

De seguida decidiu-se avaliar o efeito dos polissacarídeos na interacção entre BSA e taninos presentes directamente no vinho, e comparar os resultados com o efeito sobre as procianidinas oligoméricas.

Numa primeira fase, determinou-se a quantidade de BSA necessária para reagir com 2 ml de vinho diluído 1:50 (em solução aquosa 12% etanol, tampão acetato 0,1M a pH 5,0). Esta diluição de 1:50 foi escolhida por permitir atingir valores de NTU não superiores a 20, o que permite trabalhar nas condições ideais referidas anteriormente (Secção 4.2.2), sendo esta diluição já utilizada por outros autores (Mateus *et al.* 2004).

Adicionaram-se concentrações crescentes de BSA a diversos tubos contendo 2 ml de vinho diluído e avaliou-se a formação de agregados de proteína-tanino (Figura 4-13). Pode-se ver que a formação de agregados BSA-tanino aumentou rapidamente com o aumento da concentração de BSA, até um ponto a partir do qual a turvação aumenta ligeiramente com a adição de BSA.

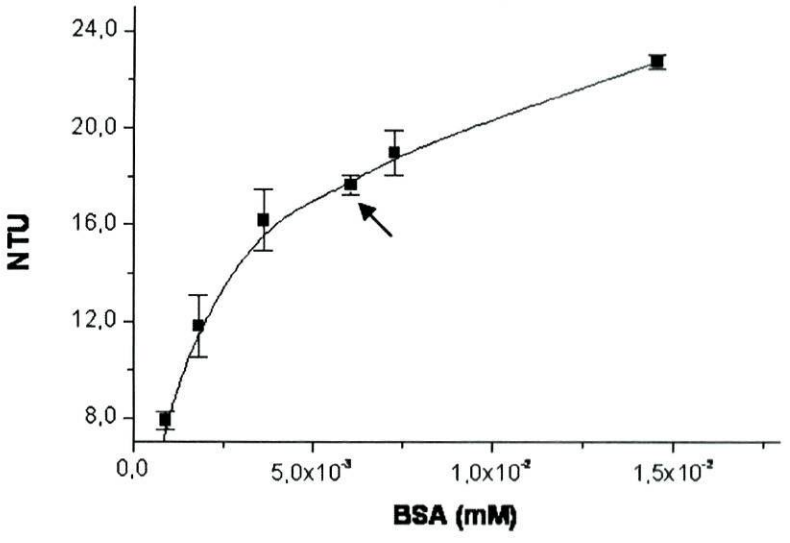


Figura 4-13: Influência da concentração de BSA na formação de agregados com taninos presentes no vinho (vinho diluído 1:50 em solução aquosa etanol 12% (v/v), tampão acetato 0,1M a pH 5,0).

Foi escolhida uma concentração de BSA de 6,1 μM (assinalada com uma seta na Figura 4-13), já que é um valor que está próximo da zona de viragem da curva. Este foi o valor adoptado para efectuar os estudos seguintes.

Uma vez definida a concentração de BSA a ser usada determinou-se o efeito de dois polissacarídeos nas interacções entre taninos presentes no vinho e a BSA. Os polissacarídeos

seleccionados para este feito foram a pectina e manoproteínas já que apresentam características estruturais dos polissacarídeos presentes no vinho (ver Secção 1.4.5.4).

Na Figura 4-14 pode-se observar a influência destes dois polissacarídeos nas interacções entre BSA e procianidinas oligoméricas (PCO) e entre BSA e taninos directamente no vinho diluído. Pode-se verificar que o efeito dos polissacarídeos é muito semelhante com as PCO e com o vinho. Por outro lado, a pectina parece ter um poder inibidor superior às manoproteínas, dado que se verificou uma maior percentagem de inibição de agregação para concentrações mais baixas de pectina.

Esta diferença poderá estar relacionada com o carácter iónico destes polissacarídeos, já que conforme foi referido anteriormente a pectina é um polissacarídeo com um elevado nível de açúcares acídicos. As manoproteínas têm também propriedades acídicas, devido à presença de resíduos manosilfosfato na sua composição (Jigami *et al.* 1999), mas poderão ser menos acídicas que a pectina usada neste estudo.

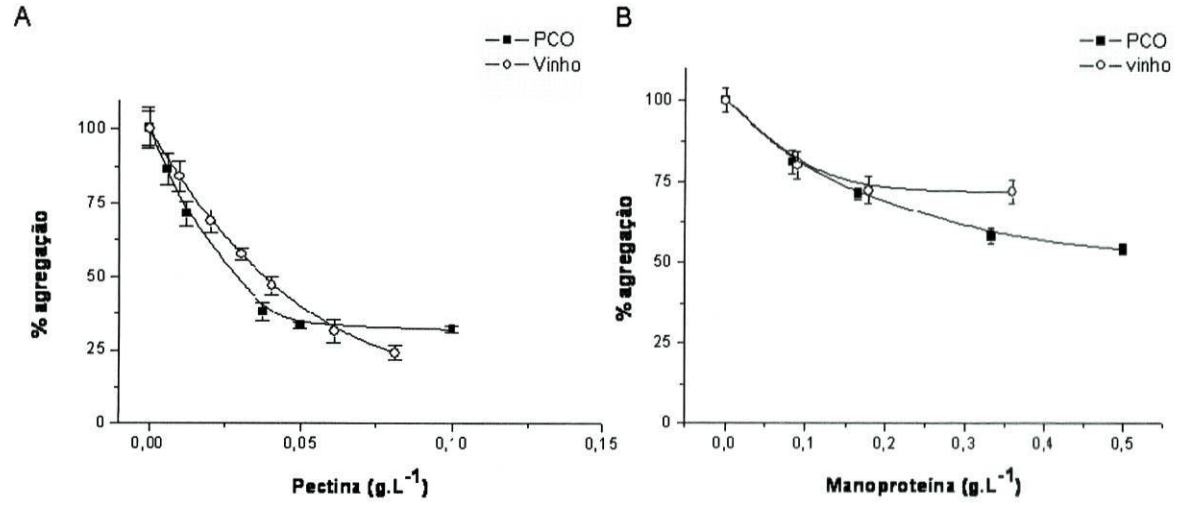


Figura 4-14: Influência da concentração de polissacarídeos (A, Pectina e B, Manoproteína) na formação de agregados entre BSA (6,1 μM) e PCO (0,10 mM) ou vinho diluído (1:50), em solução aquosa com etanol a 12%, tampão acetato 0,1 M e pH 5,0.

O facto de que os polissacarídeos inibem as interacções entre BSA e taninos do vinho de um modo semelhante ao verificado com procianidinas puras ressalva o facto dos taninos presentes no vinho (que têm estruturas mais complexas e que também contêm PCO) terem um comportamento semelhante ao das PCO no que se refere à interacção com estes carboidratos.

PARTE III

4.3 Desenvolvimento de um método de estudo das interacções entre proteínas e taninos por nefelometria em contínuo

4.3.1 Desenvolvimento de um método para o estudo das interacções entre proteína e tanino por nefelometria em contínuo

O estudo da interacção entre proteínas e taninos por técnicas em "batch" é em geral um processo moroso visto ser necessário adaptar as melhores condições de concentração dos vários componentes intervenientes (concentrações totais e relativas) e as condições do solvente, medindo por vezes pequenos volumes de amostras para os tubos de ensaio, um processo que, para além de ser lento, pode estar sujeito a variabilidades. Por outro lado as concentrações utilizadas nem sempre correspondem às estequiométricas.

Por estes motivos pensou-se em desenvolver um método que permitisse, de um modo automático, ultrapassar algumas das dificuldades anteriores, tornando o método mais rápido e fiável.

Para tal desenvolveu-se um equipamento composto por um sistema de formação de gradiente que permitisse estudar a influência da variação de concentração dos vários intervenientes em contínuo (proteína, tanino, carboidrato, etc.).

O esquema da Figura 4-15 ilustra os diferentes componentes que fazem parte do equipamento de nefelometria em contínuo.

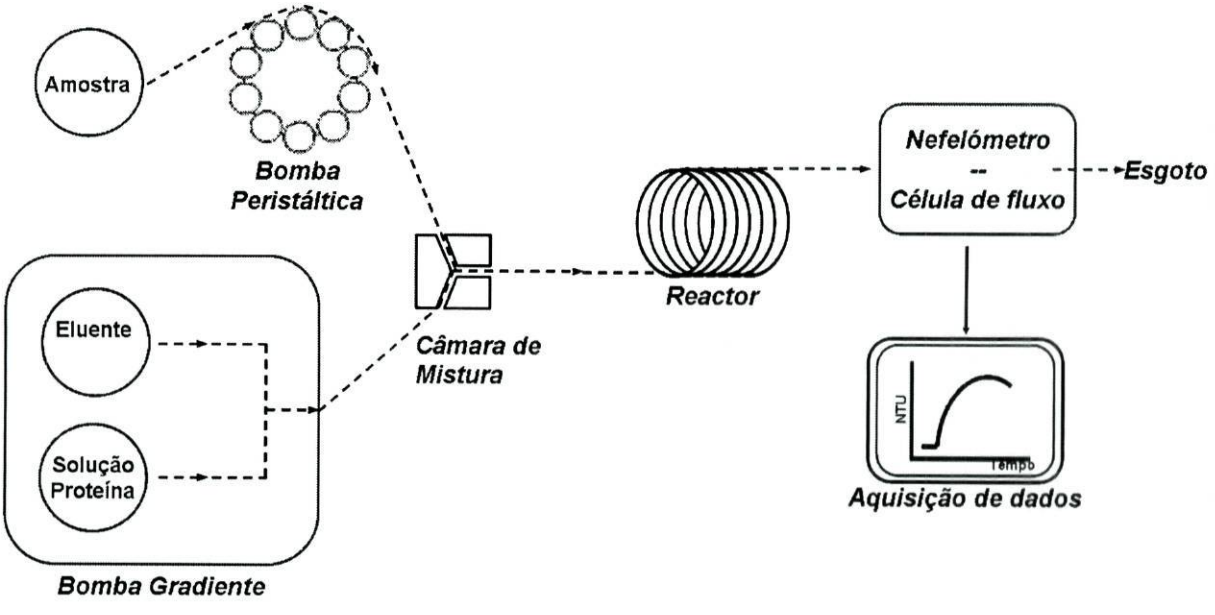


Figura 4-15: esquema do equipamento de nefelometria em contínuo. Eluente: 12% etanol (v/v), 0,1 M tampão acetato, pH 5,0. Solução de proteína: BSA em 12% etanol (v/v), 0,1 M tampão acetato, pH 5,0.

O gradiente de proteínas é formado por uma bomba de gradiente (de HPLC) enquanto que a amostra de tanino é bombeada por uma bomba peristáltica (fluxo constante). A concentração

de tanino pode ser alterada variando a concentração da solução ou simplesmente variando o fluxo da bomba peristáltica.

A proteína e o tanino entram em contacto numa câmara de mistura (de acrílico), e passam por um reactor, constituído por 3 metros de tubo de silicone (de 1,5 mm de d.i.). Durante o tempo que a mistura demora a percorrer este tubo ocorre a agregação entre a proteína e o tanino. Estes agregados passam por uma célula de vidro colocada num nefelómetro de laboratório acoplado a um computador que regista a dispersão da luz causada por agregados proteína-tanino.

Dado que não existem células de fluxo comerciais para o nefelómetro utilizado (HACH 2100N), adequadas para este fim, foi necessário desenvolver uma célula no laboratório. Optou-se então por fabricar uma célula em vidro, com forma cilíndrica com cerca de 10 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno, ligada numa das extremidade ao tubo de silicone do reactor e na outra o tubo de saída para o esgoto (Figura 4-16).

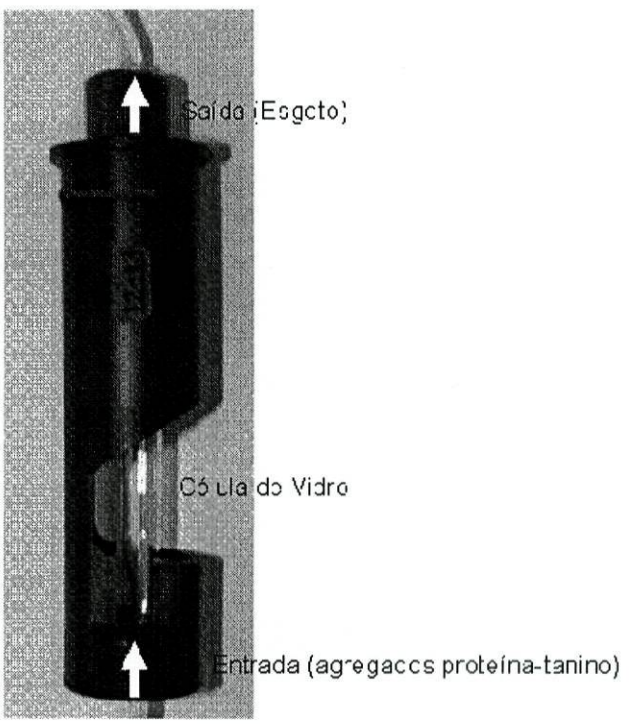


Figura 4-16: Célula de fluxo desenvolvida no laboratório

4.3.2 *Aplicação do método de nefelometria em contínuo a estudos de interacção entre procianidinas de película e de grainha de uva e a proteína BSA*

Numa primeira fase fizeram-se alguns ensaios preliminares para procurar reproduzir a experiência de nefelometria em "batch" descrita na Figura 4-7, utilizando desta vez a nefelometria em contínuo, para estudar a influência da concentração crescente de BSA na formação de complexos com as PCO.

Com a bomba de gradiente foi criado um gradiente crescente de proteína usando duas soluções: solução A, etanol 12% em água (v/v), 0,1M tampão acetato, pH 5,0; solução B, BSA (10 $g.L^{-1}$) em A.

A concentração crescente de proteína foi bombeada para a câmara de mistura onde entrou em contacto com a solução de procianidinas bombeada pela bomba peristáltica a um fluxo constante (1,0 $ml.min^{-1}$).

Nas condições de fluxo escolhido, de 1 $ml.min^{-1}$ de procianidina e de 0,5 $ml.min^{-1}$ de solução de BSA (fluxo total de 1,5 $ml.min^{-1}$), o tempo que os componentes demoram a percorrer os tubos do reactor (3 metros) e chegar à célula de leitura (tempo de reacção) é de cerca de 6 minutos que é suficiente para ocorrer agregação entre PCO e BSA.

Realizaram-se várias experiências com diversas concentrações de procianidina (0,10; 0,22; 0,27; 0,37 mM)

Verificou-se um aumento da turvação máxima como resultado da agregação com o aumento da concentração em procianidinas.

Verificou-se que para uma concentração de PCO de 0,27 mM se obtiveram valores de turvação máxima próximos de 10 NTU, o que permite trabalhar nas condições ideais referidas anteriormente (Secção 4.2.2).

A Figura 4-17 reproduz o perfil da formação de agregados proteína-tanino resultando da interacção entre procianidinas oligoméricas (PCO) e concentrações crescentes de BSA.

À semelhança do que se verificou no método em "batch" (Secção 4.2.2), existe um aumento de agregados com aumento de concentração de BSA até um ponto máximo, a partir do qual, posterior aumento de concentração de BSA leva a uma diminuição da formação de agregados.

Tal como referido anteriormente (Secção 4.2.2), esta variação da agregação com a concentração de proteína pode ser explicada se considerarmos que existe uma concentração à qual o número de locais de ligação entre as PCO e BSA é equivalente e à qual se forma uma grande rede de ligações cruzadas, correspondente ao ponto máximo de agregação e à maior

turvação da solução. Concentrações e quantidades relativas diferentes desta resultariam em agregados de menores dimensões e consequentemente numa menor dispersão de luz.

O gráfico da Figura 4-17 permite confirmar a estequiometria do complexo proteína-tanino correspondente ao ponto de máxima turvação tal como foi efectuado na Secção 4.2.2. O máximo de turvação foi atingido para uma quantidade de BSA de cerca de 27 nmol (assinalada por uma seta na Figura 4-17), sendo a quantidade de tanino presente sempre constante (0,27 μmol), indicando um ratio molar de polifenol:BSA perto de 10:1, que se encontra na mesma ordem de grandeza da estequiometria calculada anteriormente na Secção 4.2.2.

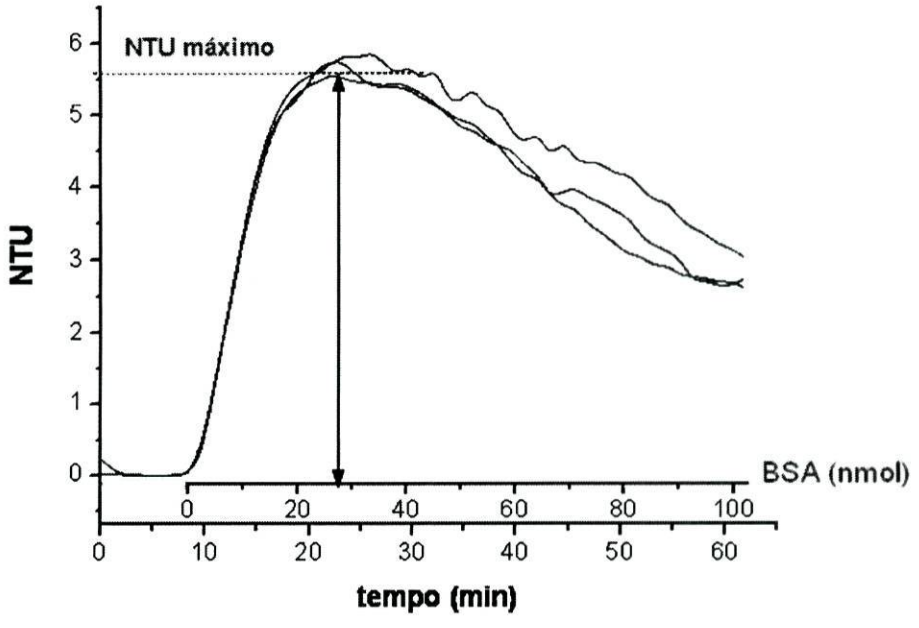


Figura 4-17: Análise por nefelometria em contínuo da formação de agregados entre PCO (0,27 mM, 1,0 ml.min^{-1}) e BSA (0,50 ml.min^{-1}). Análise em triplicado.

Foi feito um estudo semelhante usando um extracto de película de uva (Figura 4-18). Ensaios preliminares permitiram verificar que para concentrações de 4,23 g.L^{-1} o valor de turvação é próximo do obtido com as PCO. Os agregados formados entre extracto de película e BSA aumentam com aumento de concentração de proteína até um máximo a partir do qual não se verifica mais agregação. Contrariamente ao verificado com as PCO, para as concentrações estudadas, não se verifica uma diminuição importante de agregação com um excesso de BSA.

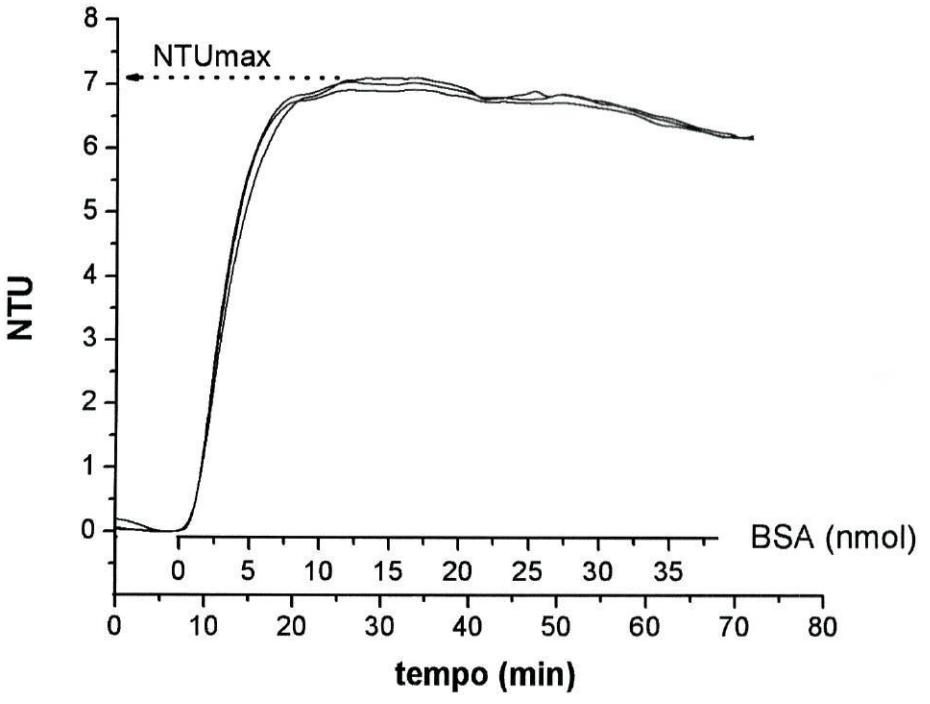


Figura 4-18: Análise por nefelometria em contínuo da formação de agregados entre taninos de película de uva (4,23 g.L^{-1}, 1,0 ml.min^{-1}) e BSA (0,5 ml.min^{-1}). Análise em triplicado.

As películas de uva contém uma grande diversidade de polifenóis, incluindo procianidinas e sobretudo prodelfinidinas com um peso molecular muito superior às procianidinas das grainhas (Souquet *et al.* 1996), com grande capacidade de se ligarem às proteínas. Por outro lado, as prodelfinidinas contêm um maior número de grupos hidroxilo comparativamente às procianidinas (mais um grupo hidroxilo por unidade estrutural), capazes de interagir com as proteínas. Este aumento de grupos hidroxilo bem como o elevado grau de polimerização poderá estar na origem de uma maior afinidade com as proteínas comparativamente com as PCO (Siebert 1999).

Esta técnica apresenta diversas vantagens relativamente aos métodos em "batch". Numa só experiência foi possível avaliar o efeito da concentração da proteína na formação de agregados e conhecer o valor de NTU máximo que representa a actividade tanante específica e é característico de cada amostra.

Por outro lado obteve-se uma boa repetibilidade dos ensaios como se pode verificar nos gráficos em triplicado (Figura 4-17 e Figura 4-18), o que evidencia a fiabilidade desta técnica.

4.3.3 Estudo por nefelometria em contínuo da interacção entre a BSA e procianidinas de diferentes pesos moleculares

Utilizando a técnica de nefelometria em fluxo contínuo, dado que permite uma rápida obtenção de uma grande variedade de dados, decidiu-se efectuar estudos com diferentes fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares (Tabela 3-2).

Foram feitas algumas experiências preliminares por nefelometria em contínuo fazendo variar a concentração de BSA para diferentes concentrações das fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares, de modo a obter as respectivas concentrações necessárias à obtenção de valores de turvação inferiores a 20 NTU, permitindo trabalhar nas condições ideais referidas anteriormente (Secção 4.2.2).

Com base nos resultados obtidos, chegou-se à conclusão que a concentração de BSA é de 0.33 $g.L^{-1}$, e a concentração de cada fracção está indicada na Tabela 4-4.

Tabela 4-4: Concentração das fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares necessárias à obtenção de valores de NTU da mesma ordem de grandeza, para uma dada concentração de BSA (0,33 $g.L^{-1}$).

Fracção	*Gama de Peso Molecular*	*[Fracção] ($g.L^{-1}$)*	*NTU*	*Ratio Tanino/BSA*[a]
I	300-600	0,73	8,3±0,2	334
II	600-900	0,37	5,3±0,1	85
III	1000-1500	0,13	8,6±0,3	24
IV	1500-1600	0,034	7,6±0,9	4
V	1600-3500	0,050	5,5±0,9	4

a: O ratio tanino/BSA foi calculado usando os valores médios de Peso Molecular da Tabela 3-2

Pode-se verificar que, para cada fracção de procianidina foi necessário utilizar uma concentração diferente de modo a obter valores de turvação da solução da mesma ordem de grandeza.

No geral, as procianidinas de menor peso molecular necessitaram de maiores concentrações para obter valores de NTU da mesma ordem de grandeza dos valores das fracções mais polimerizadas. A única excepção foi a fracção V que necessitou de uma concentração ligeiramente superior à fracção IV. Conforme já foi mencionado na Introdução (Secção 1.3.3.1), a afinidade dos polifenóis para com as proteínas parece aumentar com o aumento de grau de polimerização e de galoilação de procianidinas. Observando o número de moléculas de tanino que se liga a cada molécula de BSA (Ratio Tanino/Proteína), pode-se verificar a

existência de uma drástica diminuição nas fracções I a IV, mas que se mantêm semelhante entre as fracções IV e V.

Foi verificado por de Freitas *et al.* (2002) que as procianidinas de pesos moleculares mais elevados (superiores a 3400 Da) têm uma menor afinidade para com proteínas globulares (BSA e α-amilase) do que procianidinas com menores pesos moleculares, possivelmente devido a impedimentos estereoquímicos que limitam o número de locais de ligação (Ver Figura 1-15). É possível que o elevado peso das moléculas da fracção V a torne menos flexível e, apesar de esta ter um maior número de locais de ligação, a sua falta de flexibilidade dificulte a interacção com BSA.

4.3.4 Aplicação da nefelometria em contínuo ao estudo da influência de polissacarídeos na interacção entre proteínas e taninos

Uma das vantagens desta técnica em contínuo é a de permitir a introdução de um terceiro componente no sistema proteína-tanino e avaliar o seu efeito. Com a finalidade de estudar o efeito dos polissacarídeos na interacção entre proteínas e taninos por nefelometria em fluxo contínuo, foi introduzida uma solução C de polissacarídeos no sistema de gradiente como se pode ver na Figura 4-19.

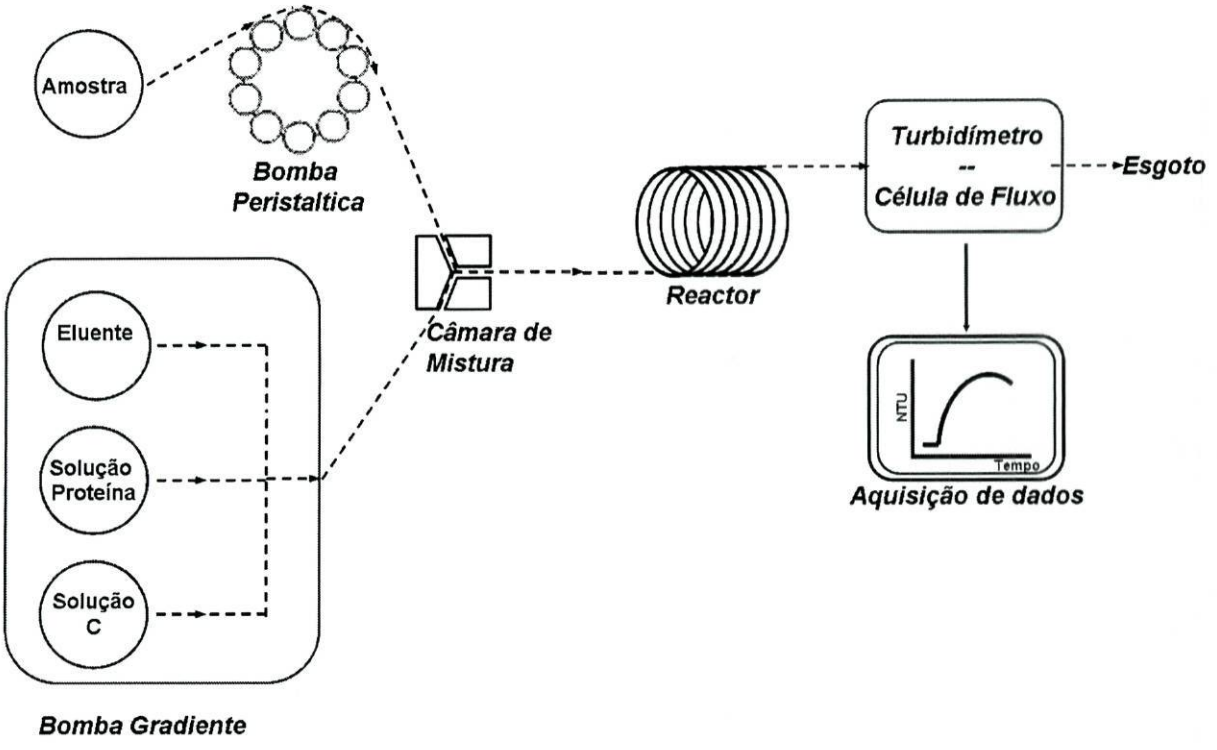


Figura 4-19: esquema do equipamento de nefelometria em contínuo, adaptado para estudar a influência de polissacarídeos. Eluente (A): 12% etanol (v/v), 0,1 M de tampão acetato, pH 5,0; solução de proteína (B): BSA em A; solução C: polissacarídeo em A.

A Figura 4-20 representa um exemplo das várias fases que compõem o estudo da influência de um polissacarídeo (neste caso a goma arábica) na interacção entre procianidinas e a BSA.

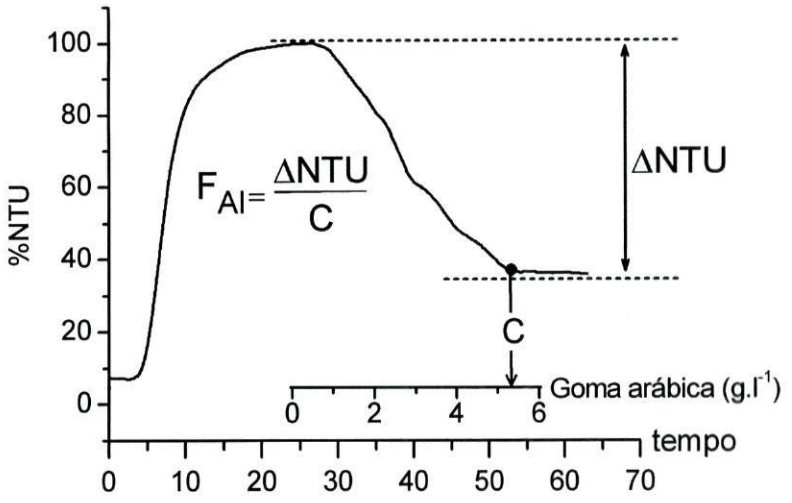


Figura 4-20: Análise por nefelometria em contínuo do efeito inibidor da goma arábica na formação de agregados entre polifenóis (Fracção IV 0,034 g.L^{-1}) e BSA (0,33g.L^{-1}).

A primeira fase parte do gráfico (dos 0 aos 25 minutos) corresponde a uma concentração constante de BSA e taninos, onde se verifica uma subida progressiva da turvação, correspondendo à estabilização da agregação de proteína e tanino, até se atingir um máximo de NTU que se mantém constante.

A partir deste máximo de agregação proteína-tanino, inicia-se um gradiente de concentração crescente de polissacarídeo que se traduz numa diminuição da luz dispersa pelos agregados em solução. Esta diminuição da turvação é indicativa da inibição da agregação entre proteínas e taninos pela goma arábica. Este comportamento foi também observado com outros polissacarídeos como o xantano e o dextrano, e utilizando outras fracções de procianidina (I, II, III e V).

De modo a analisar mais facilmente os resultados, calculou-se o Factor de inibição de agregação F_{AI} (NTU/g.L^{-1}) dividindo a diferença entre os pontos de maior e menor turvação (em NTU) pela concentração de polissacarídeo no ponto de máxima inibição (menor agregação, C), como é demonstrado na Figura 4-20.

4.3.4.1 Comparação do F_{AI} do xantano, dextrano e goma arábica na interacção entre procianidinas (Fracção V) e a BSA

O F_{AI} do xantano, dextrano e goma arábica na interacção entre as procianidinas da fracção V e a BSA está representado na Tabela 4-5. O xantano mostrou ser o polissacarídeo mais eficaz na inibição da agregação, seguido pelo dextrano e pela goma arábica.

Tabela 4-5: Factor de inibição de agregação (F_{AI}) dos diferentes polissacarídeos. FV: 0,050 g.L^{-1}; BSA: 0,33 g.L^{-1}.

Polissacarídeo	F_{AI} *(NTU/g.L^{-1})*
Xantano	60 ± 12
Dextrano	3,1 ± 0,3
Goma arábica	0,4 ± 0,04

O efeito inibidor mais elevado do xantano relativamente aos outros polissacarídeos poderá estar relacionado com a capacidade de encapsular os polifenóis impedindo-os de interagir com as proteínas, como já foi referido na Introdução (Secção 1.4.5.3).

O efeito do dextrano, ao contrário do que se verificou na Secção 4.2.4 no estudo em "batch", foi superior ao da goma arábica. No entanto, conforme foi referido por Haslam (1998), a afinidade dos polifenóis para com géis Sephadex, baseados em dextrano é fortemente influenciada por pequenas alterações na estrutura do polifenol, sendo que um aumento do seu peso molecular leva a um forte aumento da sua afinidade com o dextrano. A fracção V das procianidinas é uma fracção muito polimerizada, com um peso molecular superior a 1600, superior ao peso molecular das procianidinas utilizadas anteriormente para o estudo em "batch" (Secção 4.2.4). É possível que o dextrano tenha uma maior afinidade para com estas procianidinas de maior tamanho e como tal seja mais eficiente a inibir a interacção destes com a BSA.

O F_{AI} da goma arábica é cerca de 150 vezes inferior ao do xantano. Este resultado é semelhante ao obtido com a fracção de PCO no estudo por nefelometria em "batch" (Secção 4.2.4).

A goma arábica mostrou ser o mais fraco dos polissacarídeos estudados neste sistema. Isto poderá ser devido à sua estrutura altamente compacta e ramificada que poderá diminuir o número de locais de ligação disponíveis para interacção com o polifenol. A goma arábica é um heteropolímero composto de três fracções: uma fracção de arabinogalactana (AG), uma fracção de arabinogalactana-proteína (AGP) e uma fracção de glicoproteínas. Cerca de 2% da goma arábica é proteína. A goma arábica tem excelentes propriedades emulsionantes, particularmente devido à fracção AGP: a fracção hidrofóbica polipeptídica adsorve na interface óleo-água, enquanto que a cadeia de carboidrato estabiliza a emulsão através de repulsões estéricas e electrostáticas (Verbeken *et al.* 2003). É possível que um fenómeno semelhante tome lugar na interacção com os polifenóis: a parte hidrofóbica liga aos anéis

benzénicos polifenólicos e a fracção de carboidrato impede a proteína de interagir com os polifenóis. Apesar de tudo, estes efeitos parecem inibir menos a agregação proteína-tanino do que no caso do xantano e do dextrano.

4.3.4.2 Efeito do peso molecular das procianidinas no F_{AI} do xantano

Foi efectuado um estudo do efeito inibidor do xantano, o polissacarídeo mais eficaz no estudo anterior, na agregação entre a BSA e procianidinas de diversos pesos moleculares.

Conforme foi explicado anteriormente, utilizaram-se diferentes concentrações das diferentes fracções de taninos condensados, escolhidas de modo a obter valores de turvação não superiores a 20 NTU (Ver Secção 4.3.3).

Na Figura 4-21 pode-se ver a título de exemplo, o efeito de um gradiente de concentração crescente de xantano na agregação entre proteínas e as fracções III (A) e IV (B) de procianidinas. Comparando a diminuição da turvação em cada um dos gráficos A e B, pode-se observar que o xantano inibe a formação de agregados mais rapidamente na fracção III, de menor peso molecular, do que na fracção IV.

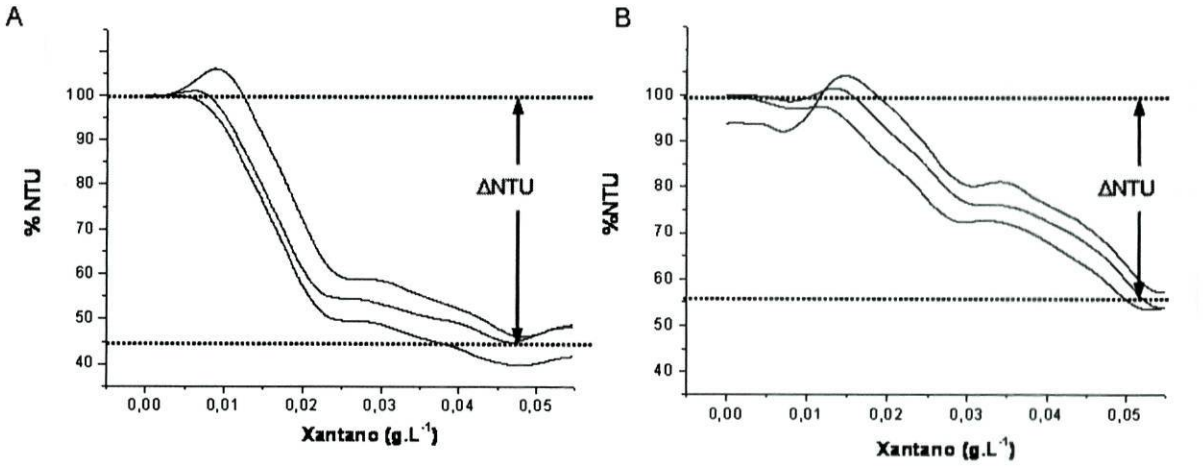


Figura 4-21. Análise por nefelometria de fluxo do poder inibidor do xantano na formação de agregados entre polifenóis e BSA (0,33 g.L^{-1}). A: fracção III (0,13 g.L^{-1}), B: fracção IV (0,034 g.L^{-1}). Estão representadas três repetições.

Os F_{AI} do xantano para as várias fracções de procianidinas de diferentes pesos moleculares encontram-se na Tabela 4-6.

Tabela 4-6: Factor de inibição de agregação (F_{AI}) do xantano sobre a interacção de BSA (0,33 $g.L^{-1}$) com procianidinas de diferentes pesos moleculares.

Fracção	*Gama de Peso Molecular*	F_{AI} *(NTU/g.L^{-1})*
I	300-600	129 ± 8
II	600-900	127 ± 5
III	1000-1500	123 ± 9
IV	1500-1600	86 ± 13
V	1600-3500	60 ± 12

Os F_{AI} podem-se dividir em dois grupos: o xantano inibe de um modo semelhante as fracções I-III e mais eficazmente do que as fracções IV e V. Estes resultados parecem apontar para uma maior eficiência do xantano na inibição das ligações proteína-tanino para fracções de menor peso molecular (I-III).

Uma explicação possível destes resultados é a de os polifenóis mais pequenos serem mais facilmente encapsulados nos poros do xantano que os polifenóis maiores, e por isso mais facilmente impedidos de interagirem com a BSA.

4.3.5 Aplicação da nefelometria em contínuo ao estudo da influência do etanol na interacção entre proteínas e taninos

O etanol é um dos constituintes mais abundantes em alimentos submetidos a fermentação alcoólica, como é o caso do vinho e da cerveja. Dado que é mais apolar que a água, o etanol altera a estrutura do solvente e afecta a solubilidade dos solutos em solução hidroalcoólica. Por estas e outras razões é de esperar que o etanol interfira na agregação entre proteínas e taninos.

Neste sentido foi estudado o efeito do etanol na interacção entre uma fracção de procianidinas (II) e a BSA usando as duas técnicas, em "batch" e em contínuo (Figura 4-22). Na técnica de nefelometria em fluxo o terceiro componente (o etanol) foi introduzido na bomba de gradiente (Solução C), à semelhança do que foi feito anteriormente para os polissacarídeos na Secção 4.3.4.

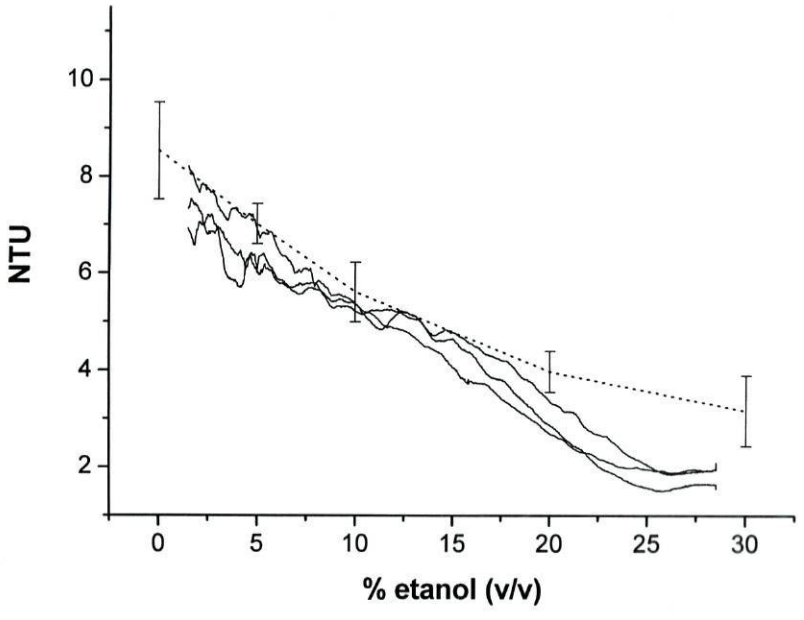


Figura 4-22: Análise por nefelometria em contínuo (linhas cheias representando 3 repetições) e por nefelometria em "batch" (linha tracejada) da influência do etanol na formação de agregados entre procianidinas (Fracção II, 0,15 mg) e BSA (0,3 mg).

Como se pode ver o etanol tem um efeito inibidor na interacção proteína-tanino nas condições estudadas. Este resultado também foi verificado por outros autores (Serafini *et al.* 1997), que verificaram uma diminuição da precipitação entre BSA e taninos de vinho tinto. Estes autores postularam que a diminuição da precipitação pelo etanol poderia ser causada por uma diminuição das interacções hidrofóbicas entre proteína e tanino. Por outro lado esta

diminuição poderia resultar também de alterações da estrutura da proteína pelo etanol, em que os grupos carbonilo das proteínas ficariam escondidos reduzindo a capacidade da proteína se ligar aos taninos.

É importante realçar, por um lado, a repetibilidade da técnica em que as três repetições são muito semelhantes e, por outro lado, que os resultados são coerentes com os resultados obtidos em "batch". Mais uma vez, esta técnica demonstra uma grande facilidade de aplicação, versatilidade e um grande potencial de aplicação. De facto, apenas mudando o solvente "C" (Figura 4-19) é possível estudar o efeito de diversos factores na interacção entre proteínas e taninos. Neste estudo estão representados o efeito do etanol e diversos polissacarídeos, mas também poderiam ser estudados o pH, a força iónica, a influência de outros solventes, etc.

4.3.6 Aplicação do método da nefelometria em contínuo a vinhos

Foi estudada por nefelometria em contínuo a interacção da BSA com os taninos dos vinhos. Foram testadas directamente diferentes quantidades de vinho variando apenas o fluxo da bomba peristáltica. Na Figura 4-23 A pode-se observar o efeito da concentração de BSA para quatro fluxos diferentes de vinho (sem qualquer diluição prévia). O valor de NTU máximo aumenta linearmente com o aumento de fluxo de vinho (Figura 4-23 B), o que é justificado pela introdução no sistema de maiores quantidades de taninos do vinho.

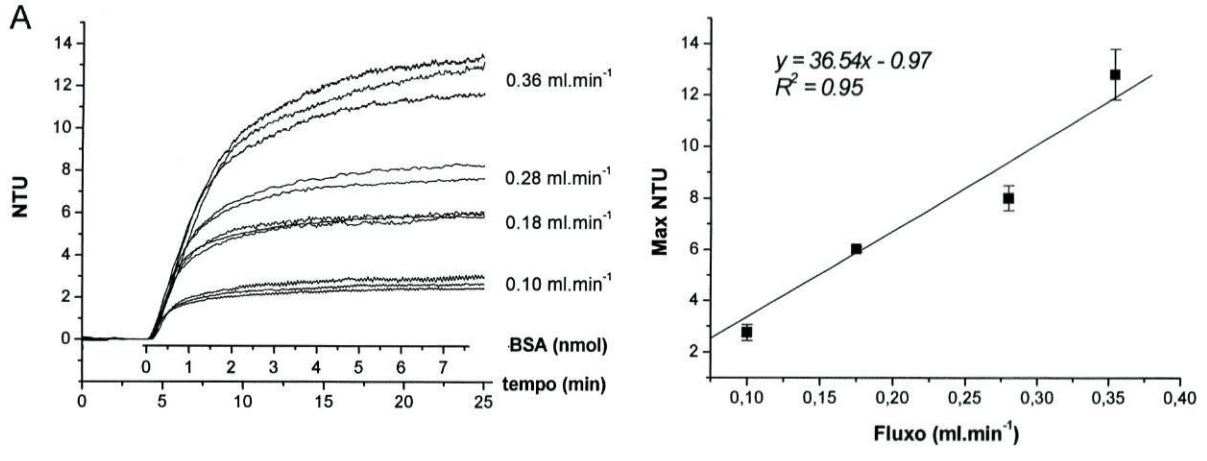


Figura 4-23: Estudo por nefelometria em contínuo do efeito da concentração de BSA na formação de agregados com taninos para 4 fluxos distintos de vinho (não diluído).

No geral, para cada fluxo de vinho o comportamento parece semelhante ao observado com o extracto de película de uva (Figura 4-18), onde não se observou uma diminuição na formação de agregados mesmo para concentrações de BSA elevadas, contrariamente ao que se observou com as procianidinas.

Na literatura (Mateus *et al.* 2004) foi definido como "actividade tanante específica" (ATE) de um vinho a turbidez máxima, expressa em NTU/ml de vinho, após reacção com uma dada concentração de proteínas, usando para o efeito o método de nefelometria em "batch".

Adaptando este parâmetro à nefelometria em contínuo, a ATE poderia ser calculada utilizando o declive da curva resultante da representação da turvação máxima em função do fluxo de vinho, como é ilustrado na Figura 4-23 B. Neste caso o valor de ATE seria 36,5 NTU/(ml.min^{-1}).

Este método em contínuo apresenta algumas vantagens relativamente ao método em "batch":

- A concentração de BSA pode-se variar, o que significa que o aumento gradual da concentração de BSA permite determinar o NTU correspondente ao máximo de

agregação de uma dada amostra (neste caso do vinho);

- Para alterar a quantidade de amostra analisada basta alterar o fluxo da bomba peristáltica;
- Outra importante vantagem prende-se com o facto de o vinho não ser previamente diluído, o que acontece nas técnicas em "batch" para poder ter leituras de turvação abaixo dos 20 NTU. O facto de não diluir o vinho permite ter em conta o estado coloidal da amostra que poderia interferir no fenómeno de agregação tanino-proteína e na adstringência. No caso das amostras diluídas o estado coloidal das partículas do vinho é alterado.

4.3.6.1 Aplicação a vinhos com diferentes quantidades de procianidinas adicionadas

Utilizou-se o método da nefelometria em contínuo para estudar a actividade tanante específica de vinhos aos quais tinham sido adicionadas diferentes quantidades de procianidinas de grainhas de uva (Figura 4-24).

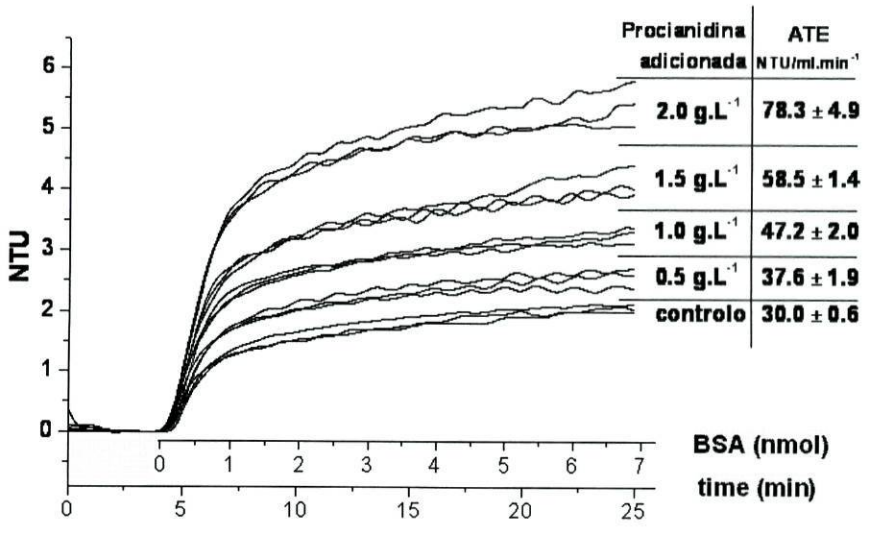


Figura 4-24: Estudo por nefelometria em contínuo do efeito da concentração de BSA na formação de agregados com taninos de vinhos enriquecidos em procianidinas. Fluxo de vinho 0,07 ml.min^{-1}.

No geral verifica-se que a ATE aumenta sistematicamente com o aumento da concentração de procianidinas. Este resultado está de acordo com resultados obtidos em "batch" para diferentes proteínas (BSA, α-amilase e PRPs salivares), utilizando estes mesmos vinhos (Mateus *et al.* 2004).

A técnica de nefelometria em contínuo, para além das vantagens já referidas, mostra também ser sensível a alterações de concentração de procianidinas mesmo numa matriz complexa como o vinho, em que estão presentes diversos outros compostos.

PARTE IV

4.4 Aplicação do fluorímetro no estudo das interacções proteína-tanino

4.4.1 Aplicação do fluorímetro em medições nefelométricas

Apesar dos resultados anteriores serem interessantes e inovadores na medida em que contribuíram para aprofundar o conhecimento sobre a interacção entre polifenóis e taninos, estes estudos foram efectuados em sistemas modelo, o que permite apenas extrapolar os resultados para os sistemas fisiológicos que estão associados ao sabor. De facto, a BSA tem sido amplamente usada como proteína modelo neste tipo de estudos, com o condicionalismo de não estar fisiologicamente envolvida no fenómeno de adstringência, e a sua estrutura ser diferente de muitas das proteínas salivares referidas na introdução.

Por esta razão procurou-se estudar a interacção dos taninos com as proteínas que estão normalmente presentes na cavidade bucal. Para este efeito foi sintetizada a IB8c, uma PRP básica, e utilizou-se α-amilase isolada de saliva humana.

No entanto, foram apenas obtidos alguns miligramas de proteínas salivares e polissacarídeos do vinho, o que tornou difícil usar a técnica de nefelometria descrita anteriormente, que apesar de sensível, requer quantidades de reagentes da ordem das dezenas de miligramas.

Por este motivo utilizou-se um fluorímetro para medir a dispersão de luz a 90° pelos agregados, visto ser um aparelho extremamente sensível e permitir utilizar pequenas quantidades de compostos.

O fluorímetro é composto por uma fonte de luz, que emite a uma gama de comprimentos de onda entre 200 e 900 nm, que passa por um sistema de monocromadores e filtros que seleccionam apenas um comprimento de onda (λ excitação). A um ângulo de 90° está localizado um segundo sistema de monocromadores e filtros que selecciona o comprimento de onda da luz que passa (λ emissão) (Figura 4-25). Se o mesmo comprimento de onda for seleccionado para ambos os monocromadores, pode-se ler a luz dispersa por partículas presentes na célula. Deste modo, seleccionando λ excitação = λ emissão, pode-se ler a luz dispersa pelos agregados proteína-tanino. Para além de ser um equipamento sensível, as leituras foram efectuadas em células com volumes da ordem dos microlitros, o que permite utilizar quantidades de reagentes muito inferiores às utilizadas no nefelómetro.

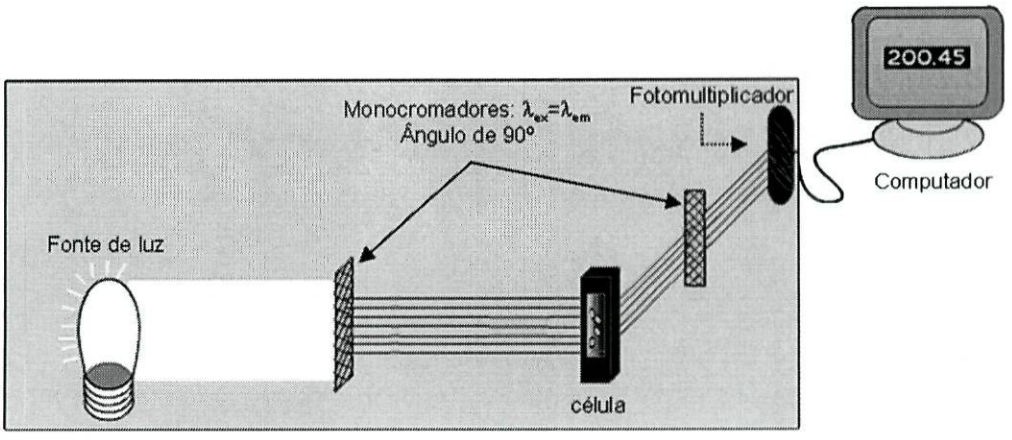


Figura 4-25: esquema simplificado de um fluorímetro

Numa primeira fase, foi necessário seleccionar o comprimento de onda ao qual se fariam as medições dos agregados. O comprimento de onda foi escolhido com base em dois factores:

– Não ocorrer absorção de radiação por parte dos componentes;

– λ mais baixos aos quais corresponde uma maior intensidade e uma melhor resposta do fluorímetro.

Assim, estudou-se o espectro de absorção de cada um dos componentes (proteínas, taninos e polissacarídeos) de modo a verificar a que comprimentos de onda estes compostos não absorvem luz. Verificou-se que 400 nm é o comprimento de onda mínimo a partir do qual nenhum destes compostos absorve.

Assim escolheu-se este comprimento de onda para os monocromadores de excitação e o de emissão,

É relevante também salientar a importância da ausência de contaminantes em solução que dispersem luz nas soluções usadas para estes estudos, dado que podem levar a uma grande interferência na dispersão de luz (Santos *et al.* 1999). Por este motivo todas as soluções foram cuidadosamente filtradas e preparadas em material de vidro cuidadosamente limpo.

4.4.2 Efeito da concentração de tanino e de proteínas salivares

Conforme já foi discutido nas secções anteriores, as interacções proteína-tanino e os tipos de agregados formados são influenciados pelas concentrações relativas de proteína e de tanino. De modo a averiguar quais as concentrações necessárias de modo a obter as concentrações estequiométricas correspondentes a um máximo de agregação em solução, efectuaram-se experiências com diferentes concentrações das proteínas salivares (α-amilase e IB8c) e

tanino. O tanino escolhido foi a Fracção IV, dado que mostrou ser a fracção mais reactiva (Tabela 4-4).

4.4.2.1 Interacção entre α-amilase e tanino condensado

Começou-se por estudar a α-amilase. Fizeram-se duas séries de experiências, em que se adicionaram concentrações crescentes da FIV de procianidinas a duas séries de tubos com 5,5 e 13,8 $mg.L^{-1}$ de α-amilase. Verificou-se que para estas séries, o máximo de agregação ocorreu com cerca de 15,6 $mg.L^{-1}$ de tanino (Figura 4-26).

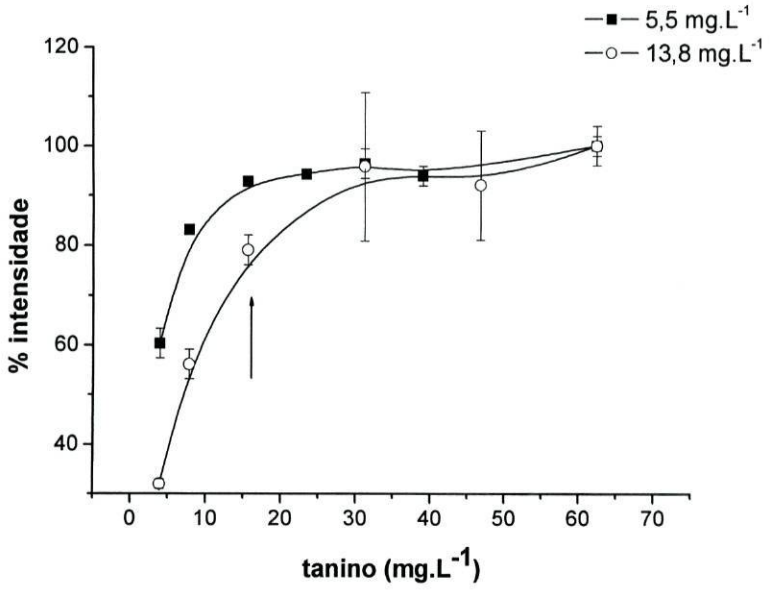


Figura 4-26: Influência da concentração de procianidinas (FIV) na interacção com α-amilase a diferentes concentrações, em solução 12% etanol, tampão acetato 5,0 mM, pH 5,0.

De seguida, fixou-se a concentração de 15,6 $mg.L^{-1}$ de tanino e fez-se reagir com concentrações crescentes de α-amilase (Figura 4-27 A). Pode-se observar que o aumento na concentração de proteína levou a um aumento na formação de agregados, até um valor máximo, a partir do qual posteriores aumentos na concentração de proteína não levaram a alterações importantes da luz dispersa pelos agregados. De modo a confirmar a máxima agregação, fixou-se a concentração de α-amilase perto deste ponto (22,0 $mg.L^{-1}$) e adicionaram-se concentrações crescentes da fracção IV de procianidinas (Figura 4-27 B). Pode-se observar um comportamento semelhante: há um aumento rápido da formação de agregados com o aumento da concentração de procianidinas, até um ponto a partir do qual o aumento da concentração não leva a alterações na agregação. Conforme esperado, a

concentração de tanino no ponto de máxima agregação (15,6 $mg.L^{-1}$) é idêntica à concentração de tanino usada no gráfico da Figura 4-27 A.

Estas concentrações de tanino e α-amilase correspondem às concentrações que permitem um máximo de dispersão de luz, definidas anteriormente como as concentrações estequiométricas.

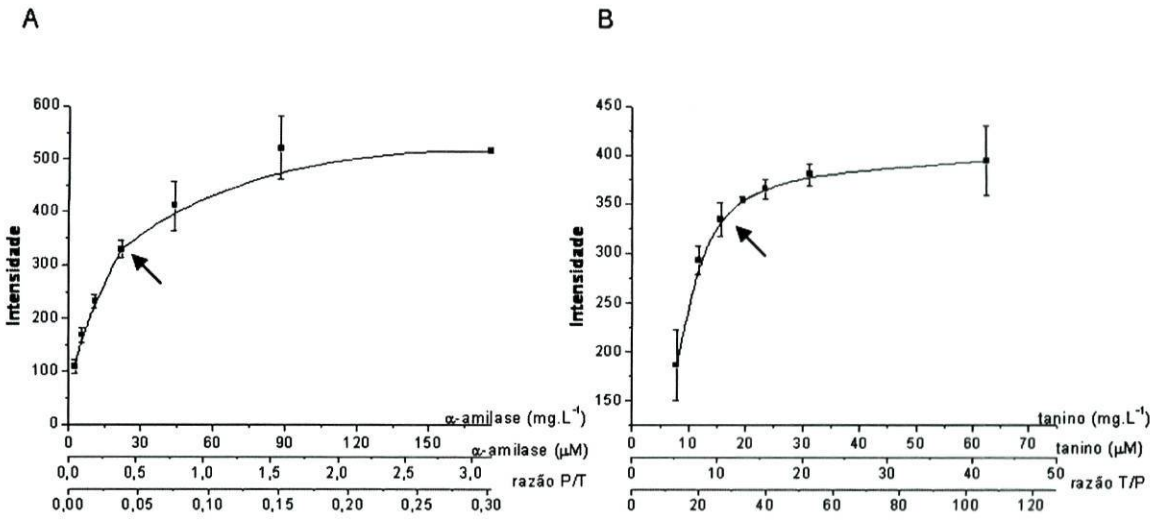


Figura 4-27: A, Influência da concentração de α-amilase na formação de agregados com taninos (procianidinas da Fracção IV, 15,6 $mg.L^{-1}$). B, Influência da concentração de tanino na formação de agregados com α-amilase 22,0 $mg.L^{-1}$. As escalas inferiores representam as concentrações em μM (calculadas usando um peso molecular médio de 1500 $g.mol^{-1}$ para o tanino e 56000 $g.mol^{-1}$ para α-amilase) e as razões molares entre proteína e tanino (P/T) e tanino e proteína (T/P).

4.4.2.2 Interacção entre IB8c e tanino condensado

Foi feito um estudo semelhante ao anterior com a proteína sintetizada IB8c. Adicionaram-se concentrações crescentes de IB8c a soluções contendo a mesma concentração de procianidinas (FIV) usado (15,6 $mg.L^{-1}$) (Figura 4-28). No entanto, verificou-se que a intensidade de luz dispersa pelos agregados era baixa e muito semelhante ao valor do branco (cerca de 300), e que com o aumento da concentração de proteína não apresentava grandes variações de intensidade, verificando mesmo uma diminuição de intensidade para concentrações mais elevadas.

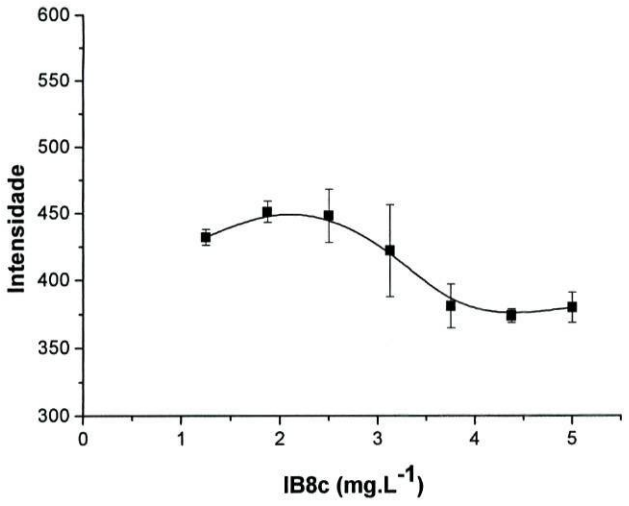


Figura 4-28: Influência da concentração de IB8c na formação de agregados com procianidinas (Fracção IV, 15,6 mg.L^{-1}).

Foi testada uma concentração de taninos condensados (Fracção IV) duas vezes superior (31,2 mg.L^{-1}) e obtiveram-se melhores resultados (Figura 4-29 A). Verificou-se um aumento da luz dispersa pelos agregados de procianidina-IBbc com o aumento da concentração de IB8c, até se atingir um máximo, a partir do qual o aumento da concentração de IB8c origina um decréscimo da intensidade de luz dispersa. Esta diminuição de agregação já foi observada e discutido em secções anteriores (Secção 1.3.2 da Introdução e Secções 4.2.2 e 4.3.2 dos Resultados e Discussão):

Na presença de proteína em excesso haveria um maior número de moléculas de proteína ligadas aos taninos e que deixavam de se efectuar ligações cruzadas entre os complexos proteína-tanino, resultando em agregados menores que induziriam uma menor dispersão de luz.

A concentração de IB8c de 3,12 mg.L^{-1} foi escolhida dado que está próxima do ponto de agregação máxima, correspondente à concentração estequiométrica. De modo a confirmar este máximo, fixou-se a concentração de IB8c e mediu-se a influência de concentrações crescentes de tanino na formação de agregados. Observou-se que a intensidade de luz dispersa aumentou com o aumento de concentração de tanino até atingir um patamar que corresponde a uma concentração de 31,2 mg.L^{-1}, como era de esperar (Figura 4-29 B).

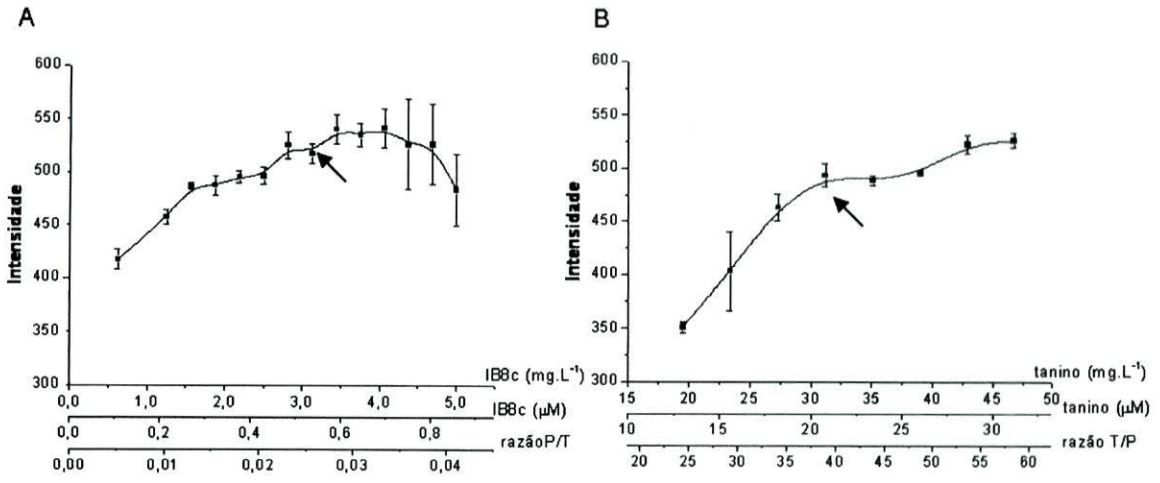


Figura 4-29: A, Influência da concentração de IB8c na formação de agregados com taninos (procianidinas da Fracção IV, 31,2 mg.L^{-1}). B, Influência da concentração de tanino na formação de agregados com IB8c (3,12 mg.L^{-1}). As escalas inferiores representam as concentrações em µM (calculadas usando um peso molecular médio de 1500 g.mol^{-1} para o tanino e 5843 g.mol^{-1} para IB8c) e as razões molares entre proteína e tanino (P/T) e entre tanino e proteína (T/P).

4.4.2.3 Comparação dos resultados

É interessante notar que as concentrações molares no ponto estequiométrico para ambas as proteínas são semelhantes: considerando que os pesos moleculares da α-amilase e da IB8c são de 56000 g.mol^{-1} e 5843 g.mol^{-1}, usaram-se concentrações molares de 0,4 e 0,5 µM, respectivamente. No entanto, a concentração estequiométrica de tanino para a IB8c foi de quase o dobro do que para a α-amilase, apesar de a primeira ser uma proteína cerca de 10 vezes menor. Esta diferença pode ser explicada pela estrutura 3D das proteínas: a α-amilase é uma proteína globular e provavelmente apenas disponibiliza os aminoácidos que se encontram à superfície para se ligarem com taninos, enquanto que a IB8c tal como as suas congéneres da mesma família adopta uma estrutura em parte desordenada (em novelo aleatório) e em parte numa conformação de hélice secundária do tipo II, fazendo com que tenha uma estrutura muito mais aberta (Simon *et al.* 2003b) podendo disponibilizar mais zonas de contacto para interagir com taninos.

Este facto corrobora a teoria de que as PRPs funcionam como proteínas tipo "esponja", aglutinadoras de taninos (Simon *et al.* 2003b). De facto, Charlton *et al.* (1996) propuseram que as múltiplas repetições da sequência de aminoácidos existentes nas proteínas salivares constituem regiões favoráveis para a interacção com taninos, permitindo à proteína enrolar-se à volta do tanino, aumentando a associação por interacções intermoleculares.

4.4.3 *Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre proteínas salivares e taninos*

Foi estudada a influência dos polissacarídeos isolados do vinho (Parte I, Secção 4.1.3) na interacção entre procianidinas (FIV) e proteínas salivares (IB8c e α-amilase).

As concentrações de procianidinas e proteínas salivares usadas são as concentrações estequiométricas determinadas no ponto anterior. Foi feito um estudo com concentrações crescentes de cada um dos polissacarídeos isolados na Secção 4.1.3: AGP0, 50 e 150, RGII, MP0 e MP50.

Experiências controlo mostraram que, para as concentrações usadas não ocorre formação de agregados em soluções de tanino e polissacarídeos pécticos (AGP0, 50 e 150 e RGII), de IB8c e polissacarídeos pécticos, e de α-amilase e de diferentes fracções de AGPs.

Verificou-se a existência de alguma dispersão de luz em soluções de α-amilase na presença de RGII que diminuiu com o aumento da concentração de RGII, sendo no entanto um efeito relativamente baixo quando comparado com a intensidade total da mistura α-amilase-tanino (cerca de 20% do valor de intensidade).

As fracções de manoproteínas (MP0 e MP50), para as concentrações mais elevadas (0,5 $g.L^{-1}$), apresentam alguma dispersão de luz. Esta dispersão aumenta ligeiramente na presença de IB8c e α-amilase sendo, no entanto, um efeito relativamente baixo quando comparado com a intensidade total da mistura IB8c-tanino (cerca de 20% do valor de intensidade). Na presença de MP e tanino, a dispersão de luz pode atingir cerca de 30% do valor da intensidade.

Estes valores obtidos nas experiências controlo não foram subtraídos aos valores obtidos após a mistura.

Os resultados são apresentados em percentagem da intensidade da luz dispersa de modo a poder comparar mais facilmente os vários polissacarídeos: a luz dispersa pela solução contendo apenas proteína e tanino foi considerada como sendo 100%, valores inferiores a 100% indicam uma menor intensidade de luz dispersa indicando uma inibição na agregação.

4.4.3.1 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre α-amilase e taninos condensados

Os gráficos da Figura 4-30 A e B mostram o efeito dos polissacarídeos pécticos e das manoproteínas, respectivamente, nas interacções entre α-amilase e a fracção IV das procianidinas.

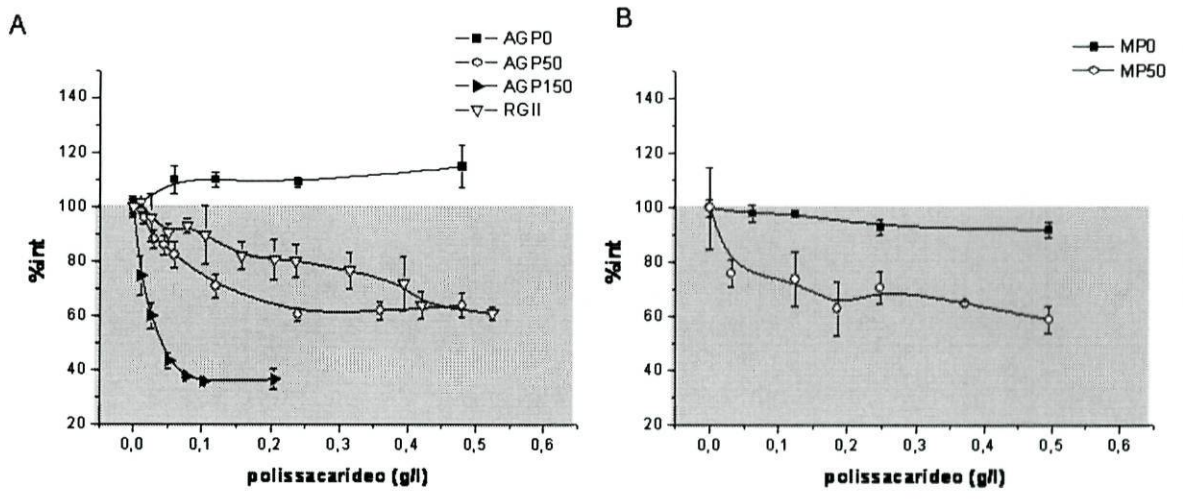


Figura 4-30: Influência da concentração de polissacarídeos na formação de agregados entre procianidinas (FIV, 15,6 mg.L^{-1}) e α-amilase (22,0 mg.L^{-1}) em solução aquosa 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0. As áreas abaixo de 100% foram sombreadas para melhor visualização.

No caso dos polissacarídeos pécticos verificou-se que os polissacarídeos AGP50, AGP150 e RGII foram capazes de inibir a agregação proteína-tanino: verifica-se uma rápida descida na intensidade da luz dispersa, com o aumento da concentração de polissacarídeos, até um ponto de inibição máxima, a partir do qual o aumento da concentração de polissacarídeo não se traduz em alterações da intensidade de luz dispersa. A AGP150, a AGP mais acídica, mostrou ser mais eficiente do que os restantes polissacarídeos, visto que, por um lado levou a uma menor intensidade de luz dispersa, e por outro lado as concentrações a que provocou esta inibição foram mais baixas. A AGP50 mostrou ser ligeiramente mais eficiente do que a RGII na inibição da agregação. O AGP0 não teve qualquer efeito inibidor da agregação nestas condições, e parece mesmo levar a um aumento de intensidade de luz dispersa.

No caso das manoproteínas, a MP0, uma manoproteína mais neutra, parece ser a menos eficiente levando apenas a uma ligeira diminuição de intensidade de luz dispersa comparativamente com a MP50 que apresenta um carácter mais iónico. A MP50 parece inibir a formação de agregados de um modo semelhante a AGP50 e RGII.

4.4.3.2 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção entre IB8c e taninos condensados

Para a IB8c os resultados são mostrados nos gráficos da Figura 4-31 (A e B).

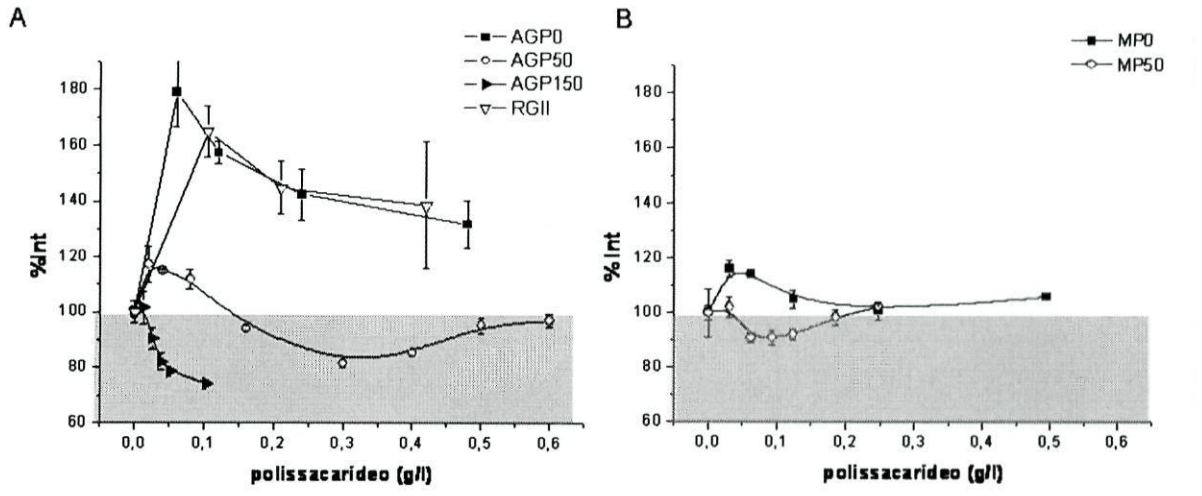


Figura 4-31: Influência da concentração de polissacarídeos na formação de agregados entre procianidinas (FIV, 31,2 mg.L^{-1}) e IB8c (3.12 mg.L^{-1}), em solução aquosa 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0. As áreas abaixo de 100% foram sombreadas para melhor visualização.

A AGP150 parece ter um comportamento semelhante ao verificado no caso da α–amilase, sendo o polissacarídeo mais eficiente na diminuição da agregação. A AGP50, por seu lado, mostrou um comportamento relativamente sinuoso: a baixas concentrações verificou-se um aumento da agregação, com o aumento da concentração de AGP50 verificou-se uma diminuição da formação de agregados que volta a aumentar para os valores iniciais de 100% para as concentrações mais elevadas testadas. Aparentemente a AGP50 é eficiente a inibir a interacção proteína-tanino numa gama limitada de concentrações que é superior à que se encontram normalmente nos vinhos. Na presença de AGP0 e de RGII verificou-se um aumento de agregação.

No caso das manoproteínas, a MP0 mostrou um aumento de agregação para as concentrações mais baixas. A MP50 mostrou alguma inibição para as concentrações mais baixas, tendo um efeito bastante semelhante ao da AGP50.

4.4.3.3 Discussão dos resultados

Conforme já foi referido, o método de isolamento dos polissacarídeos do vinho baseou-se no método descrito por Vernhet *et al.* (1996). Os autores verificaram que, no caso dos polissacarídeos pécticos, os polissacarídeos são carregados negativamente e que as suas densidades de carga estão relacionadas com a sua ordem de eluição de DEAE-Sephacel e com o seu conteúdo de ácido urónico (sendo que o mais carregado é mais rico em ácidos urónicos e elui da coluna de troca iónica com as concentrações superiores de NaCl). Parece seguro

assumir que os polissacarídeos isolados neste trabalho seguem a mesma sequência por ordem decrescente de densidade de carga: AGP150>AGP50>AGP0. No mesmo estudo, o RGII é descrito como o polissacarídeo com a maior densidade de carga negativa de todos os polissacarídeos pécticos.

No caso das manoproteínas a sua carga parece estar relacionada com o seu conteúdo em grupos fosfato, que não foi aqui determinado, no entanto, dado que também neste caso a densidade de cargas parece seguir a ordem de eluição da coluna de troca iónica (Vernhet *et al.* 1996), podemos assumir que a carga de MP50 é superior à carga de MP0.

Assim, é interessante notar que a inibição da formação de agregados entre ambas as proteínas e os taninos condensados por parte das AGPs e das MPs parece estar relacionada com as suas cargas: a AGP mais eficiente foi a que tem um maior carácter iónico e o mesmo aconteceu no caso das MPs.

Vernhet *et al.* (1996) sugeriram que os polissacarídeos do vinho formariam ligações electrostáticas e iónicas com outros compostos e partículas presentes no vinho. Assim é possível que a inibição de formação de agregados proteína-tanino por parte das AGPs e das MPs esteja relacionada com as suas características iónicas.

Riou *et al.* (2002) verificaram que os taninos isolados de grainha de uva (procianidinas) formam agregados entre si, em soluções de vinho modelo, a valores de concentrações que se encontram no vinho. Estes autores estudaram a capacidade dos polissacarídeos do vinho interferirem com a agregação dos taninos e verificaram que, de entre os diferentes polissacarídeos estudados, uma fracção de AGP acídica e duas fracções de MPs inibem o crescimento dos agregados de taninos.

Tal como foi proposto anteriormente (Figura 4-12 e Secção 1.4.5.3), estes polissacarídeos poderiam impedir a formação de complexos proteína-tanino por um lado, através de uma interacção com os polifenóis que dificultaria os polifenóis de interagir com as proteínas, ou, por outro lado, inibindo a formação de grandes agregados pela formação de complexos ternários polissacarídeo-proteína-polifenol, que teriam uma maior solvatação devido ao carácter hidrofílico dos polissacarídeos estudados.

A fracção mais neutra de AGP (AGP0) apresentou o efeito oposto na agregação entre taninos e proteínas aumentando a formação de agregados. Este efeito é relativamente pequeno no caso da α–amilase e bastante evidente no caso de IB8c. Isto poderia ser devido a uma co-agregação de AGP0 com complexos de proteína e tanino, formando agregados maiores, como foi anteriormente sugerido para o caso do efeito do dextrano na interacção entre PCO e BSA (Secção 4.2.4).

O RGII mostrou um comportamento diferente para com α–amilase e IB8c: parece ser relativamente eficaz a inibir a formação de agregados entre α–amilase e tanino mas, pelo contrário, parece favorecer a formação de agregados entre IB8c e tanino. Devido ao facto de se ter observado alguma agregação entre α-amilase e RGII nas experiências controlo, é possível que o RGII previna a formação de agregados de α-amilase-tanino através de uma ligação a esta proteína.

No caso da interacção da IB8c com tanino observa-se um aumento de agregação para as concentrações mais baixas dos polissacarídeos testados. É possível que estes polissacarídeos se liguem a agregados de proteína-tanino formando complexos ternários, não sendo capazes de impedir as ligações cruzadas entre os agregados a concentrações baixas, mas aumentando o tamanho dos agregados.

4.4.4 Influência da força iónica na interacção entre tanino e proteínas salivares.

Foi estudado o efeito da força iónica nas interacções proteína-tanino entre as proteínas salivares e a fracção IV nas concentrações definidas na Secção 4.4.2 (Figura 4-32).

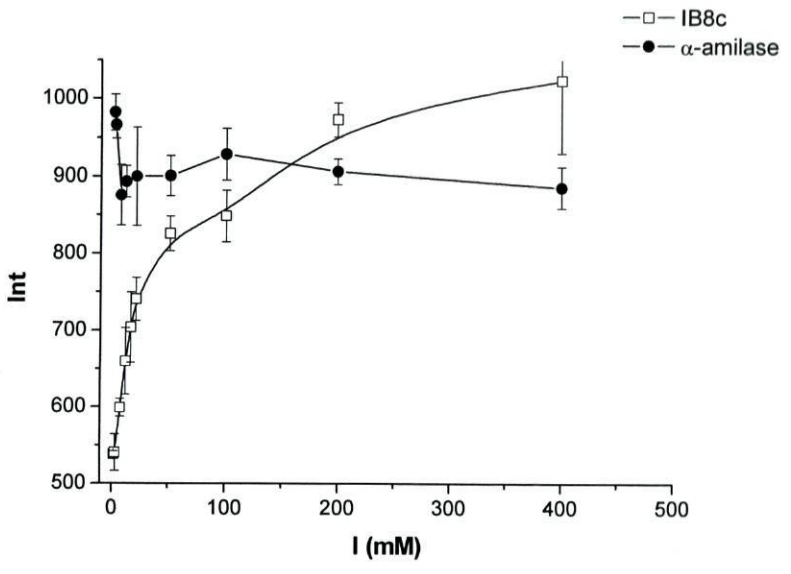


Figura 4-32: Influência da força iónica na interacção entre procianidinas (FIV, 15,6 mg.L^{-1}) e α-amilase (22,0 mg.L^{-1}) e entre procianidinas (FIV, 31,2 mg.L^{-1}) e IB8c (3.12 mg.L^{-1}), em solução 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0.

Experiências controlo mostraram que a presença de NaCl nas soluções contendo apenas proteína ou apenas tanino não provocou um aumento da dispersão de luz nas concentrações usadas.

A força iónica inicial das soluções foi de 2,0 mM correspondendo à concentração dos iões presentes na solução de tampão acetato utilizada (3,1 mM).

Pode-se observar que um aumento da força iónica parece ter um pequeno efeito inibidor na agregação entre a α-amilase e o tanino. Inversamente, no caso da IB8c, verificou-se um aumento importante da luz dispersa pelos agregados com o aumento da força iónica.

Em ambas as proteínas o efeito mais pronunciado da força iónica verificou-se para valores inferiores a 100 mM.

A α-amilase e a IB8c têm pontos isoeléctricos de 6,34 e 11,39, respectivamente (calculados no Swiss-Prot, códigos P04745 e P02812, respectivamente), o que sugere que a pH 5 ambas as proteínas estão positivamente carregadas. O facto do ponto isoeléctrico da α–amilase estar muito mais próximo do pH deste estudo, poderá significar que se encontra menos carregada do que a IB8c e por isso apresentar um menor efeito com o aumento da força iónica.

A diminuição da interacção entre α-amilase e tanino pode ser explicada, tal como proposto anteriormente para o caso da BSA (Secção 4.2.3), pela adsorção de iões à superfície do tanino, dificultando a interacção com proteínas, ou à adsorção à superfície do complexo proteína-tanino levando a uma maior solvatação. Também é possível que a presença de sal em solução altere a estrutura da α-amilase, mudando a exposição de alguns resíduos de aminoácidos com a consequente diminuição da interacção com os polifenóis.

É possível que o efeito oposto da força iónica na interacção entre tanino e IB8c se deva a um efeito "escudo", em que os iões (Cl^-) compensam a carga positiva da proteína facilitando a agregação com taninos através de ligações cruzadas. Alternativamente poderia ser um efeito de solvente, em que os iões seriam hidratados removendo o solvente e facilitando a complexação entre a proteína IB8c e o tanino.

Já foi discutida na Introdução (Secção 1.3.1) a controvérsia relativa ao tipo de interacção que rege as interacções proteína tanino, ligações de hidrogénio e/ou hidrofóbicas. O efeito, aparentemente oposto, da força iónica nas interacções entre as proteínas estudadas e os taninos parecem indicar diferenças no mecanismo de interacção, que se devem sobretudo a diferenças estruturais das proteínas ao nível do seu tamanho, conformação, ponto isoeléctrico e composição em aminoácidos.

4.4.5 *Influência da força iónica no efeito dos polissacarídeos sobre as interacções proteína-tanino*

No decorrer das experiências verificou-se que o efeito de alguns polissacarídeos era muito afectado pela presença de iões em solução (quer de NaCl, quer do tampão acetato). Por este motivo decidiu-se efectuar algumas experiências com uma força iónica de 12,4 mM, um valor superior à usada anteriormente nas experiências da Secção 4.4.3 (2,0 mM) de modo a poder avaliar melhor este efeito. Os resultados da força iónica 2,0 mM já foram discutidos na Secção 4.4.3, e nesta Secção discutir-se-á apenas a diferença dos efeitos dos polissacarídeos a diferentes forças iónicas.

4.4.5.1 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção α-amilase-tanino a duas forças iónicas

Na Figura 4-33 pode-se comparar o efeito dos polissacarídeos nas interacções entre α-amilase e a Fracção IV das procianidinas a duas forças iónicas: 2,0 mM e 12,4 mM.

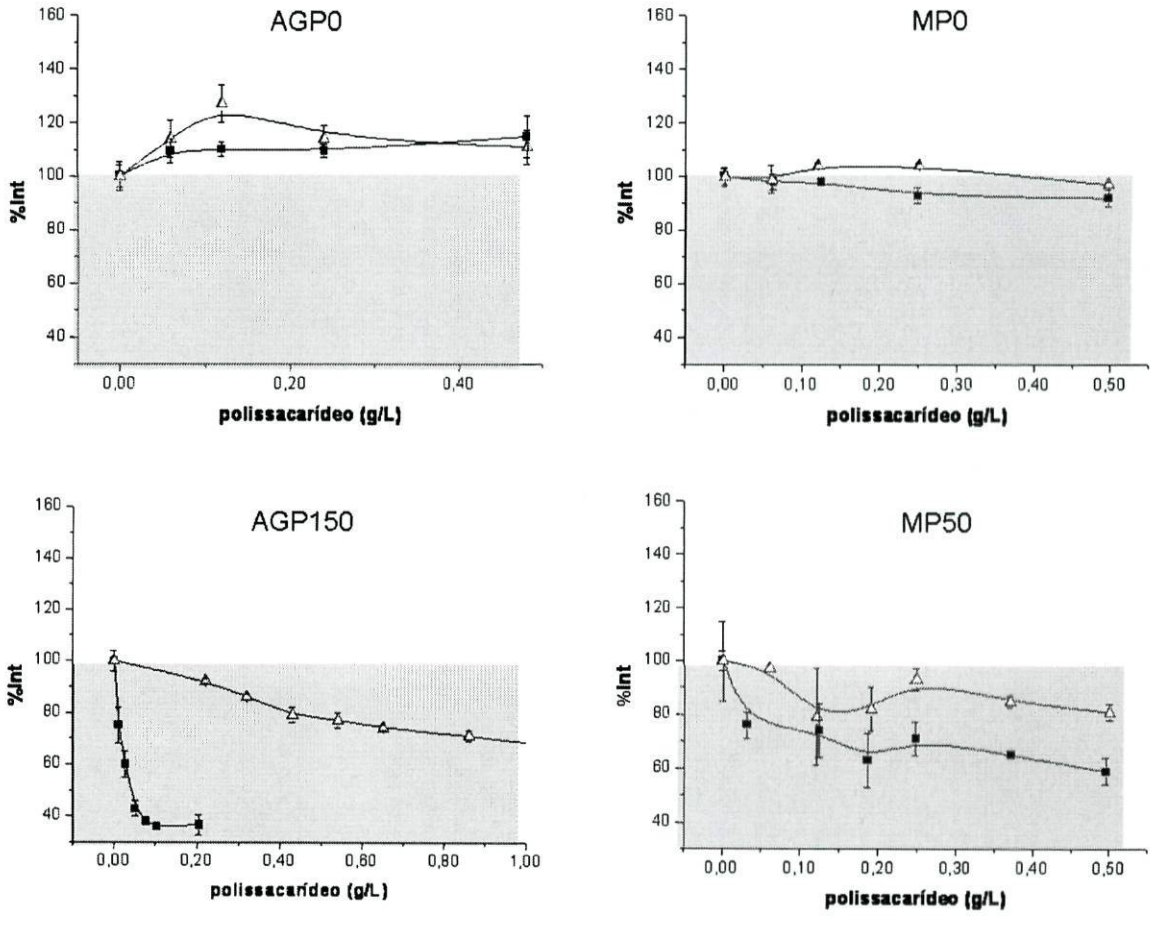


Figura 4-33: Efeito da força iónica (■, 2,0 mM e △, 12,4 mM) na inibição da interacção entre a fracção IV das procianidinas e α-amilase por parte de polissacarídeos neutros (AGP0 e MP0) e acídicos (AGP150

e MP50). As áreas abaixo de 100% foram sombreadas para melhor visualização. Procianidinas: FIV 15,6 mg.L^{-1}, α-amilase: 22,0 mg.L^{-1}, 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0.

Pode-se observar que os polissacarídeos neutros AGP0 e MP0 não apresentam nenhum efeito significativo na inibição da agregação para as duas forças iónicas estudadas. No caso de AGP0, verifica-se mesmo um ligeiro aumento na % de agregação. Por outro lado, os polissacarídeos mais iónicos, AGP150 e MP50, parecem ter um efeito inibidor muito superior para os valores de força iónica mais baixa, 2,0 mM. Este fenómeno é mais evidente no AGP150 onde se verificou um máximo de inibição a uma concentração de polissacarídeos relativamente baixa (~0,1 g.L^{-1}). Para a I=12,4 mM, a uma concentração de AGP150 dez vezes superior (1 g.L^{-1}), ainda não se tinha atingido o máximo de inibição.

A uma força iónica superior, há uma maior concentração de iões em solução. É possível que estes iões (particularmente o catião Na^+) sejam atraídos pelas cargas negativas à superfície dos polissacarídeos e as neutralizem, diminuindo assim o seu carácter iónico e fazendo com que os polissacarídeos acídicos passem a comportar-se como polissacarídeos neutros, sendo menos efectivos na inibição da agregação.

4.4.5.2 Influência dos polissacarídeos do vinho na interacção IB8c-tanino a duas forças iónicas

No caso de IB8c, pode-se observar que a força iónica tem efeitos semelhantes ao apresentado pela α-amilase (Figura 4-34).

No caso dos polissacarídeos neutros (AGP0 e MP0), não se verificou nenhum efeito inibidor na interacção IB8c-tanino a nenhuma das forças iónicas estudadas, pelo contrário, verificou-se um aumento na intensidade da luz dispersa como resultado da agregação, sobretudo no caso da AGP0.

No caso do polissacarídeo iónico AGP150 verificou-se uma inibição de agregação da ordem dos 20% para valores de força iónica mais baixa. Quando I=12,4 mM, a mesma % de inibição de agregação só é atingida para concentrações de AGP150 cerca de quatro vezes superiores.

Comparativamente à α-amilase, a MP50 não parece ser muito eficaz na inibição de agregação entre a IB8c e os taninos, e o pequeno efeito inibidor que tinha na força iónica mais baixa, perdeu-se totalmente para I=12,4 mM.

Estes resultados parecem confirmar a importância do carácter iónico dos polissacarídeos no mecanismo de inibição, particularmente no caso da α-amilase.

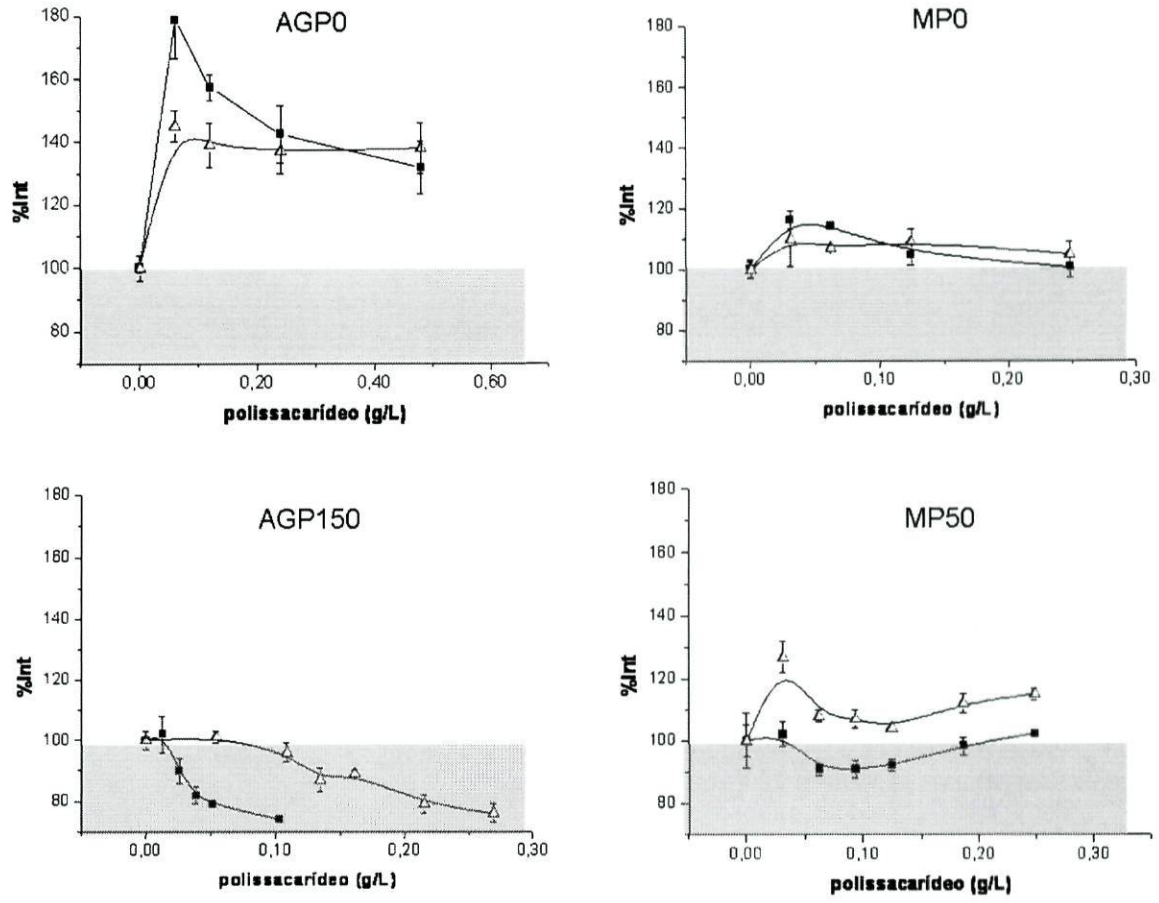


Figura 4-34: Efeito da força iónica (■, 2,0 mM e △, 12,4 mM) na inibição da interacção entre a fracção IV das procianidinas e IB8c por parte de polissacarídeos neutros e acídicos. As áreas abaixo de 100% foram sombreadas para melhor visualização. Procianidinas: 31,2 mg.L^{-1}, IB8c: 3.12 mg.L^{-1}, 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0.

4.4.5.3 Influência da goma arábica na interacção entre proteínas salivares e taninos a duas forças iónicas

A goma arábica é um polissacarídeo complexo que é utilizado em enologia como estabilizador de limpidez, dado que previne problemas de precipitação férrica e cúprica e previne a floculação de compostos fenólicos e pigmentos (Ribéreau-Gayon *et al.* 2004). Decidiu-se então que seria interessante estudar também o efeito da goma arábica na interacção entre as duas proteínas salivares e as procianidinas, às duas forças iónicas estudadas anteriormente (Figura 4-35).

Pode-se observar que a goma arábica tem a capacidade de inibir as interacções entre ambas as proteínas e a fracção IV de procianidina estudada, apresentando um efeito semelhante ao do AGP150, particularmente no caso da α-amilase (Figura 4-33). No caso da α-amilase o efeito

inibidor aumenta com a diminuição da força iónica. No entanto, no caso de IB8c, parece ocorrer o efeito oposto: verifica-se uma menor percentagem de agregação para valores de força iónica maiores.

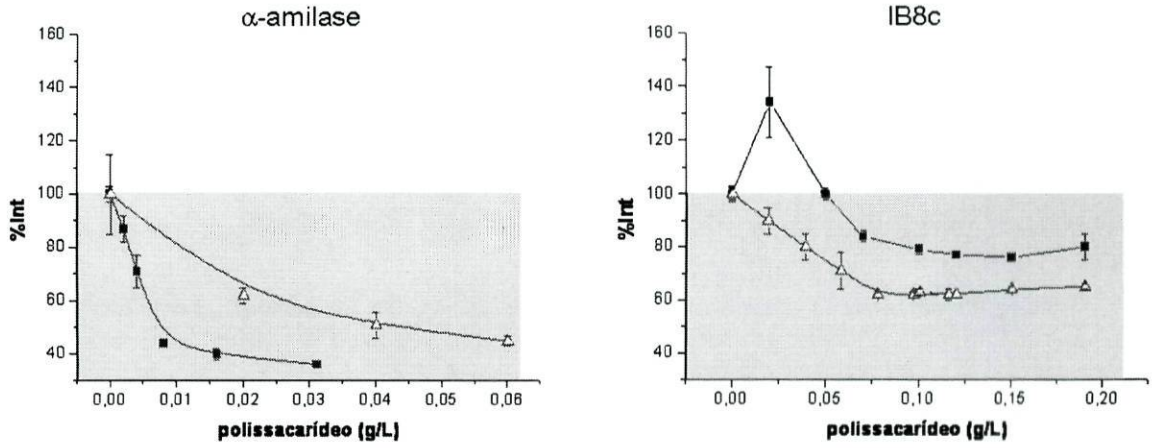


Figura 4-35: Efeito da força iónica (■, 2,0 mM e △, 12,4 mM) na inibição da goma arábica sobre a interacção entre procianidinas (FIV, 15,6 mg.L^{-1}) e α-amilase (22,0 mg.L^{-1}) e entre procianidinas (FIV, 31,2 mg.L^{-1}) e IB8c (3.12 mg.L^{-1}), em solução aquosa 12% etanol, tampão acetato 3,1 mM, pH 5,0. As áreas abaixo de 100% foram sombreadas para melhor visualização.

Aparentemente os mecanismos envolvidos na inibição pelos polissacarídeos da agregação IB8c-tanino envolvem mais do que interacções iónicas, particularmente no caso da goma arábica.

É possível que uma das fracções que constituem a goma arábica (a goma arábica é uma mistura complexa de macromoléculas, constituída por AGP, AG e GP, tal como foi discutido na Secção 4.3.4.1) esteja envolvida em interacções específicas com a IB8c ou com complexos IB8c-tanino, podendo inclusive estas interacções serem de natureza hidrofóbica, sendo desse modo diferentemente afectados pela presença de uma maior quantidade de iões em solução.

4.4.6 Possível relevância do efeito dos polissacarídeos a nível sensorial

Em que se traduzem os efeitos dos polissacarídeos nas interacções proteína-tanino em termos sensoriais? Alguns polissacarídeos (AGP150 para α-amilase e IB8c, RGII e MP50 para α-amilase) mostraram ter efeito inibidor na agregação a concentrações relativamente baixas (a partir de 20 $mg.L^{-1}$), e inferiores às respectivas concentrações no vinho.

Isto poderia significar que vinhos ricos em taninos e potencialmente adstringentes (rústicos na gíria dos enólogos) poderão ser mais suaves e aveludados (redondos) na boca, devido à presença destes polissacarídeos.

Por outro lado, outros polissacarídeos mostraram ter um efeito inverso (AGP0 e RGII no caso de IB8c) e poderiam contribuir para um aumento da sensação de adstringência.

A IB8c parece ser menos afectada pela presença de polissacarídeos. De facto, a AGP150, apesar de ser nesta proteína eficaz a concentrações muito baixas, levou apenas a uma diminuição da agregação de cerca de 20%. Como foi discutido na Secção 1.4.3.1, é atribuída às PRPs básicas uma função protectora, dado que complexam os taninos inibindo os seus potenciais efeitos negativos na digestão. Esta alta capacidade de complexar taninos, mesmo na presença de polissacarídeos, parece confirmar esta função protectora.

Apesar de terem um baixo efeito sobre as PRPs, os polissacarídeos podem apresentar um efeito na adstringência. Segundo Gambuti *et al.* (2006) a sensação de adstringência não parece estar relacionada com a precipitação de PRPs básicas. Estas proteínas precipitam totalmente mesmo a baixas concentrações de tanino e não se verifica um aumento de precipitação a altas concentrações de tanino, onde se observa um aumento da sensação de adstringência. Por outro lado, os mesmos autores verificaram que existe uma correlação directa entre a precipitação de outras proteínas salivares, entre as quais α-amilase, e a adstringência. De facto, verificou-se que estas proteínas precipitam gradualmente com o aumento da concentração de tanino, de um modo directamente relacionado com o aumento da sensação de adstringência por provadores. Esta sensação poderá ser modulada pela presença de certos polissacarídeos.

No entanto, é necessário ter cuidado na extrapolação destes resultados para o fenómeno de adstringência, dado que, conforme se verificou, uma pequena variação de força iónica pode afectar significativamente a interacção proteína-tanino e o efeito inibidor dos polissacarídeos nesta interacção.

Vidal *et al.*(2004a) exploram as sensações causadas pelas interacções entre taninos, etanol, antocianinas e polissacarídeos do vinho (uma fracção contendo uma mistura de MPs e AGPs neutras e uma fracção de RGII) em solução de vinho modelo. Estes autores não estudaram o

efeito das AGPs e MPs mais acídicas. O efeito mais determinante foi o da concentração de tanino. As intensidades de todos os descritores de adstringência aumentaram com a concentração de tanino e diminuíram na presença de RGII. No entanto, o efeito do RGII foi suprimido a concentrações mais elevadas de procianidinas. O RGII teve um efeito de diminuir a sensação de secura e de presença de partículas na boca ("chalkiness") característico da adstringência, mas este efeito não se verifica quando estão simultaneamente presentes polissacarídeos neutros, sugerindo que estes últimos inibem os efeitos de RGII.

O que é importante salientar é a complexidade do processo de construção da percepção sensorial, que depende não só de cada componente individualmente, mas também de interacções entre os vários componentes. Por esta razão é preciso ter um grande cuidado na extrapolação deste tipo de informação ao nível sensorial.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo utilizaram-se diferentes técnicas e métodos baseados na dispersão da luz para medir as interacções entre proteínas e taninos, numa tentativa de perceber melhor aquele que se pensa ser o mecanismo base da sensação de adstringência.
Os métodos aqui utilizados revelaram-se convenientes para o estudo das interacções proteína-tanino. A nefelometria é uma técnica relativamente sensível, simples e versátil para estes estudos.

Numa primeira fase efectuaram-se estudos em sistemas modelo, utilizando a proteína BSA, disponível comercialmente. Com base neste sistema modelo verificou-se que:

- Nas interacções entre BSA e procianidinas oligoméricas, existe um aumento de agregação com o aumento da concentração de proteína levando a crer que, dependendo das concentrações relativas de proteína e tanino podem-se formar diferentes tipos de agregados participando em ligações cruzadas;
- As interacções entre BSA e procianidinas diminuem com o aumento da força iónica, sugerindo ligações hidrofílicas mas que também podem ser devidas a alterações da estrutura da BSA na presença de NaCl;
- Na presença de diversos polissacarídeos existe uma diminuição da agregação entre BSA e procianidinas.
    - Polissacarídeos iónicos como a pectina, ácido poligalacturónico, goma arábica ou xantano são mais eficientes sugerindo que têm a capacidade de formar complexos ternários proteína-tanino-polissacarídeo;
    - O elevado efeito do xantano sugere que poderá existir um encapsulamento dos polifenóis por parte deste polissacarídeo que tem a capacidade de formar uma rede ordenada em solução;
    - Os polissacarídeos neutros como a ciclodextrina e o arabinogalactano tiveram um efeito menos acentuado na inibição de agregação proteína-tanino. O carboidrato glucose teve também uma influência na diminuição das interacções proteína-tanino, o que poderá ser importante em termos sensoriais dado que para além de contribuírem para o sabor doce dos alimentos é possível que também contribuam para a sua adstringência, o que pode ser um factor importante em alguns alimentos tais como vinho do Porto.

Numa segunda fase desenvolveu-se um equipamento de fluxo contínuo que permitiu estudar as interacções proteína tanino de um modo mais rápido e fácil. O método revelou ser

fidedigno e a possibilidade de mudar o fluxo dos diferentes componentes revelou ser muito funcional, permitindo efectuar diversas análises.

- Este método possibilita efectuar gradientes de concentração de proteína. Usando este método confirmou-se a influência da concentração de BSA sobre a agregação desta proteína com proantocianidinas de grainha e de película. Verificou-se uma grande repetibilidade entre diferentes análises;
- Este método possibilita a introdução de um gradiente de concentração de um terceiro componente:
    - Usando este método avaliou-se o poder inibidor de diversos polissacarídeos. O xantano revelou ser mais eficaz sobre procianidinas de menores pesos moleculares;
    - Este método permitiu avaliar o efeito de um gradiente de concentração crescente de etanol. Verificou-se que o etanol leva a uma diminuição de agregação procianidina-BSA. Este efeito foi confirmado pelo método em "batch", e verificou-se a fiabilidade do método.
- O método permite ainda avaliar rapidamente a ATE de vinhos sem qualquer diluição prévia, provando ainda ser sensível a alterações no conteúdo polifenólico, mesmo em matrizes complexas como o vinho;

Dado que se queria estudar este fenómeno usando não compostos modelo mas os compostos directamente envolvidos na adstringência, procedeu-se à obtenção destes compostos:

- Procedeu-se à síntese química em fase sólida da PRP básica IB8c;
- Isolaram-se diversas fracções de polissacarídeos de vinho. Analisando o conteúdo destas fracções em monossacarídeos puderam classificar-se estas fracções em AGPs, MPs e RGII.

Dado que estes compostos (as proteínas salivares e os polissacarídeos do vinho) foram difíceis de obter e apenas se conseguiram pequenas quantidades, começou-se a utilizar uma técnica extremamente sensível para a determinação da dispersão de luz. Utilizou-se um fluorímetro com ambos os monocromadores dispostos ao mesmo comprimento de onda e que nestas condições mede a luz dispersa a 90º por partículas presentes em solução.
Utilizando estas técnicas, conseguiram-se obter novos conhecimentos relativos às interacções entre proteína e tanino.

- Verificou-se que nas interacções entre os taninos e as proteínas salivares, existe uma grande dependência entre a concentração de proteína e a agregação. É de salientar portanto o cuidado necessário quando se efectuam estudos de natureza comparativa de seleccionar concentrações equivalentes;
- Um aumento de força iónica teve efeitos dramaticamente diferentes nas diferentes proteínas, o que evidencia a diversidade de factores que podem influenciar a natureza das interacções proteína tanino;
- Os polissacarídeos do vinho mostraram a capacidade de inibir a agregação entre proteínas e taninos. Esta capacidade parece ser superior em polissacarídeos iónicos. Verificou-se que as fracções mais acídicas de AGP e MP mostraram melhor capacidade de inibir a interacção entre proteínas, e fizeram-no a concentrações às quais estão presentes no vinho, o que pode significar um efeito a nível sensorial. No entanto, dada a complexidade da construção da sensação de adstringência, e dado o possível efeito de outros componentes do vinho e da presença de outras proteínas salivares, é necessário cuidado na extrapolação para uma situação de adstringência;

6 REFERÊNCIAS

Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K e Walter, P (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science.

Artz, WE, Bishop, PD, Dunker, AK, Schanus, EG e Swanson, BG (1987), "Interaction Of Synthetic Proanthocyanidin Dimer And Trimer With Bovine Serum-Albumin And Purified Bean Globulin Fraction G-1" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35** (3): 417-421.

Asano, K, Shinagawa, K e Hashimoto, N (1982), "Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation" *American Society of Brewing Chemists Journal* **40** (4): 147-154.

Asquith, TN e Butler, LG (1986), "Interactions Of Condensed Tannins With Selected Proteins" *Phytochemistry* **25** (7): 1591-1593.

Azen, EA (1993), "Genetics Of Salivary Protein Polymorphisms" *Critical Reviews In Oral Biology & Medicine* **4** (3-4): 479-485.

Azen, EA, Latreille, P e Niece, RL (1993), "Prb1 Gene Variants Coding For Length And Null Polymorphisms Among Human Salivary Ps-Proline-Rich, Pmf-Proline-Rich, Pms-Proline-Rich, And Pe-Proline-Rich Proteins (PRPs)" *American Journal Of Human Genetics* **53** (1): 264-278.

Bacon, JR e Rhodes, MJC (1998), "Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (12): 5083-5088.

Bacon, JR e Rhodes, MJC (2000), "Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (3): 838-843.

Bate-Smith, EC (1973), "Hemanalysis of Tannins - Concept of Relative Astringency" *Phytochemistry* **12** (4): 907-912.

Bate-Smith, EC e Swain, T (1962). *Comparative Biochemistry*. New York, Academic Press.

Baxter, NJ, Lilley, TH, Haslam, E e Williamson, MP (1997), "Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation" *Biochemistry* **36** (18): 5566-5577.

Beart, JE, Lilley, TH e Haslam, E (1985), "Plant Polyphenols - Secondary Metabolism and Chemical Defense - Some Observations" *Phytochemistry* **24** (1): 33-38.

Belitz, HD e Grosch, W (1987). *Food chemistry*. Berlin, Springer-Verlag.

Bennick, A (2002), "Interaction of plant polyphenols with salivary proteins" *Critical Reviews In Oral Biology & Medicine* **13** (2): 184-196.

Breslin, PAS, Gilmore, MM, Beauchamp, GK e Green, BG (1993), "Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation " *Chemical Senses* **18**: 403-417.

Brummell, DA e Harpster, MH (2001), "Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants" *Plant Molecular Biology* **47** (1-2): 311-340.

Cai, KH e Bennick, A (2006a), "Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture" *Biochemical Pharmacology* **72** (8): 974-980.

Cai, KH, Hagerman, AE, Minto, RE e Bennick, A (2006b), "Decreased polyphenol transport across cultured intestinal cells by a salivary proline-rich protein" *Biochemical Pharmacology* **71** (11): 1570-1580.

Calderon, P, Vanburen, J e Robinson, WB (1968), "Factors Influencing Formation of Precipitates and Hazes by Gelatin and Condensed and Hydrolyzable Tannins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **16** (3): 479-482.

Caridi, A (2006), "Enological functions of parietal yeast mannoproteins" *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* **89** (3-4): 417-422.

Chapon, L (1993), "Nephelometry as a Method for Studying the Relations between Polyphenols and Proteins" *Journal of the Institute of Brewing* **99** (1): 49-56.

Chapon, L, Urion, E e Chollot, B (1961), "Etude Physico-Chimique Des Associations Entre Proteines Vegetales Et Substances Polyphenoliques" *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique* **43** (2-3): 429-442.

Charlton, AJ, Baxter, NJ, Khan, ML, Moir, AJG, Haslam, E, Davies, AP e Williamson, MP (2002a), "Polyphenol/peptide binding and precipitation" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (6): 1593-1601.

Charlton, AJ, Baxter, NJ, Lilley, TH, Haslam, E, McDonald, CJ e Williamson, MP (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.

Charlton, AJ, Haslam, E e Williamson, MP (2002b), "Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time- averaged nuclear Overhauser effects" *Journal of the American Chemical Society* **124** (33): 9899-9905.

Chen, YM e Hagerman, AE (2004), "Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and beta-1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (12): 4008-4011.

Cheynier, V (2005), "Polyphenols in foods are more complex than often thought" *American Journal Of Clinical Nutrition* **81** (1): 223S-229S.

Clifford, MN (1997). Astringrency. *Phytochemistry of Fruits and Vegetables: proceedings of the phytochemical society of Europe*. FA Tomás-Barberán e RJ Robins, Oxford University Press.

Clifford, MN e Scalbert, A (2000), "Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** (7): 1118-1125.

Coimbra, MA, Goncalves, F, Barros, AS e Delgadillo, I (2002), "Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (12): 3405-3411.

Condelli, N, Dinnella, C, Cerone, A, Monteleone, E e Bertuccioli, M (2005), "Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: criteria for panel selection and preliminary application on wine samples" *Food Quality and Preference*.

Critchley, HD e Rolls, ET (1996), "Responses of Primate Taste Cortex Neurons to the Astringent Tastant Tannic Acid" *Chemical Senses* **21**: 135-145.

de Freitas, V e Mateus, N (2001), "Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (2): 940-945.

de Freitas, V e Mateus, N (2002), "Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82** (1): 113-119.

de Freitas, VAP, Glories, Y, Bourgeois, G e Vitry, C (1998), "Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry" *Phytochemistry* **49** (5): 1435-1441.

De Wijk, RA e Prinz, JF (2006), "Mechanisms underlying the role of friction in oral texture" *Journal Of Texture Studies* **37** (4): 413-427.

Doco, T, O'Neill, MA e Pellerin, P (2001), "Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives" *Carbohydrate Polymers* **46** (3): 249-259.

Doco, T, Quellec, N, Moutounet, M e Pellerin, P (1999), "Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines" *American Journal of Enology and Viticulture* **50** (1): 25-32.

Doco, T, Vuchot, P, Cheynier, V e Moutounet, M (2003), "Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees" *American Journal of Enology and Viticulture* **54** (3): 150-157.

Doco, T, Williams, P, Moutounet, M e Pellerin, P (2000), "Les polysaccharides du vin" *bulletin de l'O.I.V.* **73** (837-838): 785-792.

Dodds, MWJ, Johnson, DA e Yeh, CK (2005), "Health benefits of saliva: a review" *Journal Of Dentistry* **33** (3): 223-233.

Edelmann, A e Lendl, B (2002), "Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin- protein interactions based on FTIR spectroscopy" *Journal of the American Chemical Society* **124** (49): 14741-14747.

Escot, S, Feuillat, M, Dulau, L e Charpentier, C (2001), "Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency" *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7** (3): 153-159.

Fickel, J, Pitra, C, Joest, BA e Hofmann, RR (1999), "A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins" *Comparative Biochemistry And Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **122** (2): 225-229.

Frazier, RA, Papadopoulou, A e Green, RJ (2006), "Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41** (5): 1602-1605.

Frazier, RA, Papadopoulou, A, Mueller-Harvey, I, Kissoon, D e Green, RJ (2003), "Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (18): 5189-5195.

Fry, SC (1995), "Polysaccharide-Modifying Enzymes In The Plant-Cell Wall" *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **46**: 497-520.

Gaffney, SH, Martin, R, Lilley, TH, Haslam, E e Magnolato, D (1986), "The Association of Polyphenols with Caffeine and Alpha- Cyclodextrin and Beta-Cyclodextrin in Aqueous-Media" *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (2): 107-109.

Gambuti, A, Rinaldi, A, Pessina, R e Moio, L (2006), "Evaluation of aglianico rape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction" *Food Chemistry* **97** (4): 614-620.

Gawel, R (1998), "Red wine astringency: a review" *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**: 74-95.

Gawel, R, Iland, PG e Francis, IL (2001), "Characterizing the astringency of red wine: a case study" *Food Quality and Preference* **12** (1): 83-94.

Gawel, R, Oberholster, A e Francis, IL (2000), "A "Mouth-feel Wheel": terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine" *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**: 203-207.

Gonçalves, F, Heyraud, A, De Pinho, MN e Rinaudo, M (2002), "Characterization of white wine mannoproteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (21): 6097-6101.

Green, BG (1993), "Oral Astringency - A Tactile Component Of Flavor" *Acta Psychologica* **84** (1): 119-125.

Green, MS e Jucha, E (1986), "Association Of Serum-Lipids With Coffee, Tea, And Egg Consumption In Free-Living Subjects" *Journal Of Epidemiology And Community Health* **40** (4): 324-329.

Hagerman, AE (2001), "Are dietary polyphenols available for bioactivity?" *Polyphenols Actualités* **21**: 18-23.

Hagerman, AE e Butler, LG (1980), "Determination Of Protein In Tannin-Protein Precipitates" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28** (5): 944-947.

Hagerman, AE e Butler, LG (1981), "The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions" *Journal of Biological Chemistry* **256** (9): 4494-4497.

Hagerman, AE, Rice, ME e Ritchard, NT (1998), "Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin(16) (4 -> 8) catechin (procyanidin)" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (7): 2590-2595.

Halliwell, B, Aeschbach, R, Loliger, J e Aruoma, OI (1995), "The Characterization Of Antioxidants" *Food And Chemical Toxicology* **33** (7): 601-617.

Haslam, E (1974), "Polyphenol-Protein Interactions" *Biochemical Journal* **139** (1): 285-288.

Haslam, E (1996), "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action" *Journal of Natural Products* **59** (2): 205-215.

Haslam, E (1998). *Pratical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*, Cambridge University Press.

Haslam, E e Lilley, TH (1988), "Natural astringency in foodstuffs _ a molecular interpretation" *Critical reviews in food science and nutrition* **27** (1): 1-40.

Hatano, T e Hemingway, RW (1996), "Association of (+)-catechin and catechin-(4 alpha->8)-catechin with oligopeptides" *Chemical Communications* (22): 2537-2538.

Hatano, T, Hori, M, W.Hemingway, R e Yoshida, T (2003), "Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol –serum albumin complexes" *Phytochemistry* **63** (7): 817 –823.

Hatano, T, Yoshida, T e Hemingway, RW (1999). Interaction of flavonoids with peptides and proteins and conformations of dimeric flavonoids in solution. *Plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. Ka Gross et al. New York, Plenum Publishers: 527-543.

Hayashi, N, Ujihara, T e Kohata, K (2005), "Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin" *Bioscience Biotechnology And Biochemistry* **69** (7): 1306-1310.

Hofmann, T, Glabasnia, A, Schwarz, B, Wisman, KN, Gangwer, KA e Hagerman, AE (2006), "Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (25): 9503-9509.

Horne, J, Hayes, J e Lawless, HT (2002), "Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances" *Chemical Senses* **27** (7): 653-659.

Howitz, KT, Bitterman, KJ, Cohen, HY, Lamming, DW, Lavu, S, Wood, JG, Zipkin, RE, Chung, P, Kisielewski, A, Zhang, LL, Scherer, B e Sinclair, DA (2003), "Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan" *Nature* **425** (6954): 191-196.

Huber, DJ (1983), "Polyuronide Degradation And Hemicellulose Modifications In Ripening Tomato Fruit" *Journal Of The American Society For Horticultural Science* **108** (3): 405-409.

Jigami, Y e Odani, T (1999), "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan" *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1426** (2): 335-345.

Jobstl, E, Howse, JR, Fairclough, JPA e Williamson, MP (2006), "Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (12): 4077-4081.

Jobstl, E, O'Connell, J, Fairclough, JPA e Williamson, MP (2004), "Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions" *Biomacromolecules* **5** (3): 942-949.

Johansson, AK, Lingstrom, P, Imfeld, T e Birkhed, D (2004), "Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion" *European Journal Of Oral Sciences* **112** (6): 484-489.

Kallithraka, S, Bakker, J e Clifford, MN (1997), "Effect of pH on astringency in model solutions and wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (6): 2211-2216.

Kallithraka, S, Bakker, J e Clifford, MN (1998), "Evidence that salivary proteins are involved in astringency" *Journal Of Sensory Studies* **13** (1): 29-43.

Kallithraka, S, Bakker, J e Clifford, MN (2001), "Interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81** (2): 261-268.

Kandra, L, Gyemant, G, Zajacz, A e Batta, G (2004), "Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase" *Biochemical And Biophysical Research Communications* **319** (4): 1265-1271.

Kauffman, DL, Bennick, A, Blum, M e Keller, PJ (1991), "Basic Proline-Rich Proteins From Human Parotid-Saliva - Relationships Of The Covalent Structures Of 10 Proteins From A Single Individual" *Biochemistry* **30** (14): 3351-3356.

Kauffman, DL e Keller, PJ (1979), "Basic Proline-Rich Proteins In Human-Parotid Saliva From A Single Subject" *Archives Of Oral Biology* **24** (4): 249-256.

Kawamoto, H, Mizutani, K e Nakatsubo, F (1997a), "Binding nature and denaturation of protein during interaction with galloylglucose" *Phytochemistry* **46** (3): 473-478.

Kawamoto, H e Nakatsubo, F (1997b), "Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation" *Phytochemistry* **46** (3): 479-483.

Kawamoto, H, Nakatsubo, F e Murakami, K (1995), "Quantitative-Determination of Tannin and Protein in the Precipitates by High-Performance Liquid-Chromatography" *Phytochemistry* **40** (5): 1503-1505.

Kawamoto, H, Nakatsubo, F e Murakami, K (1996), "Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation" *Phytochemistry* **41** (5): 1427-1431.

Khanbabaee, K e van Ree, T (2001), "Tannins: Classification and definition" *Natural Product Reports* **18** (6): 641-649.

Khemtemourian, L, Sani, MA, Bathany, K, Grobner, G e Dufourc, EJ (2006), "Synthesis and secondary structure in membranes of the Bcl-2 anti-apoptotic domain BH4" *Journal Of Peptide Science* **12** (1): 58-64.

Laborde, B, Moine-Ledoux, V, Richard, T, Saucier, C, Dubourdieu, D e Monti, JP (2006), "PVPP-polyphenol complexes: A molecular approach" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (12): 4383-4389.

Lawless, HT, Corrigan, CJ e Lee, CB (1994), "Interactions Of Astringent Substances" *Chemical Senses* **19** (2): 141-154.

Le Bourvellec, C, Bouchet, B e Renard, 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.

Lee, CB e Lawless, HT (1991), "Time-Course Of Astringent Sensations" *Chemical Senses* **16** (3): 225-238.

Lesschaeve, I e Noble, AC (2005), "Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences" *American Journal Of Clinical Nutrition* **81** (1): 330S-335S.

Lin, HC, Chen, PC, Cheng, TJ e Chen, RLC (2004), "Formation of tannin-albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques" *Analytical Biochemistry* **325** (1): 117-120.

Llaudy, MC, Canals, R, Canals, JM, Rozes, N, Arola, L e Zamora, F (2004), "New method for evaluating astringency in red wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (4): 742-746.

Lu, Y e Bennick, A (1998), "Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins" *Archives Of Oral Biology* **43** (9): 717-728.

Luck, G, Liao, H, Murray, NJ, Grimmer, HR, Warminski, EE, Williamson, MP, Lilley, TH e Haslam, E (1994), "Polyphenols, Astringency and Proline-Rich Proteins" *Phytochemistry* **37** (2): 357-371.

Macheix, J, Fleuriet, A e Jay-Allemand, C (2005). *Les Composés Phénoliques des Végétaux*. Lausanne.

Manach, C, Scalbert, A, Morand, C, Remesy, C e Jimenez, L (2004), "Polyphenols: food sources and bioavailability" *American Journal Of Clinical Nutrition* **79** (5): 727-747.

Mateus, N, Marques, S, Goncalves, AC, Machado, JM e De Freitas, V (2001), "Proanthocyanidin composition of red Vitis vinifera varieties from the Douro valley during ripening: Influence of cultivation altitude" *American Journal of Enology and Viticulture* **52** (2): 115-121.

Mateus, N, Pinto, R, Ruao, P e de Freitas, V (2004), "Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins" *Food Chemistry* **84** (2): 195-200.

Maury, C, Sarni-Manchado, P, Lefebvre, S, Cheynier, V e Moutounet, M (2003), "Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines" *American Journal of Enology and Viticulture* **54** (2): 105-111.

McDougall, GJ, Shpiro, F, Dobson, P, Smith, P, Blake, A e Stewart, D (2005a), "Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (7): 2760-2766.

McDougall, GJ e Stewart, D (2005b), "The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes" *Biofactors* **23** (4): 189-195.

McManus, JP, Davis, KG, Beart, JE, Gaffney, SH, Lilley, TH e Haslam, E (1985), "Polyphenol Interactions.1. Introduction - Some Observations on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides" *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (9): 1429-1438.

Messana, I, Cabras, T, Inzitari, R, Lupi, A, Zuppi, C, Olmi, C, Fadda, MB, Cordaro, M, Giardina, B e Castagnola, M (2004), "Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach" *Journal Of Proteome Research* **3** (4): 792-800.

Michaud, MMJ, Lagaze, P e Masquelier, J (1971), "Fractionnement des oligomeres flavanoliques du raisin" *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **110**: 111-116.

Monteleone, E, Condelli, N, Dinnella, C e Bertuccioli, M (2004), "Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds" *Food Quality and Preference* **15**: 761-769.

Moure, A, Cruz, JM, Franco, D, Dominguez, JM, Sineiro, J, Dominguez, H, Nunez, MJ e Parajo, JC (2001), "Natural antioxidants from residual sources" *Food Chemistry* **72** (2): 145-171.

Mueller-Harvey, I (2006), "Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86** (13): 2010-2037.

Murray, NJ e Williamson, MP (1994a), "Conformational Study Of A Salivary Proline-Rich Protein Repeat Sequence" *European Journal of Biochemistry* **219** (3): 915-921.

Murray, NJ, Williamson, MP, Lilley, TH e Haslam, E (1994b), "Study Of The Interaction Between Salivary Proline-Rich Proteins And A Polyphenol By 1H-NMR Spectroscopy" *European Journal of Biochemistry* **219** (3): 923-935.

Naczk, M, Oickle, D, Pink, D e Shahidi, F (1996), "Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of pH, tannin, and protein concentrations" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44** (8): 2144-2148.

Naczk, M e Shahidi, F (2006), "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41** (5): 1523-1542.

Naurato, N, Wong, P, Lu, Y, Wroblewski, K e Bennick, A (1999), "Interaction of tannin with human salivary histatins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (6): 2229-2234.

O'Neill, MA, Ishii, T, Albersheim, P e Darvill, AG (2004), "Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide" *Annual Review Of Plant Biology* **55**: 109-139.

Oh, HI, Hoff, JE, Armstrong, GS e Haff, LA (1980), "Hydrophobic Interaction In Tannin-Protein Complexes" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28** (2): 394-398.

Orgogozo, JM, Dartigues, JF, Lafont, S, Letenneur, L, Commenges, D, Salamon, R, Renaud, S e Breteler, M (1997), "Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area" *Revue Neurologique* **153** (3): 185-192.

Ozawa, T, Lilley, TH e Haslam, E (1987), "Polyphenol Interactions - Astringency and the Loss of Astringency in Ripening Fruit" *Phytochemistry* **26** (11): 2937-2942.

Papadopoulou, A e Frazier, RA (2004), "Characterization of protein-polyphenol interactions" *Trends in Food Science & Technology* **15** (3-4): 186-190.

Papadopoulou, A, Green, RJ e Frazier, RA (2005), "Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (1): 158-163.

Pedersen, AM, Bardow, A, Jensen, SB e Nauntofte, B (2002), "Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion" *Oral Diseases* **8** (3): 117-129.

Peleg, H, Gacon, K, Schlich, P e Noble, AC (1999), "Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** (8): 1123-1128.

Pellerin, P e Brillouet, JM (1992), "Study of red wine polysaccharides fractionated by ion-exchange chromatography" *Vitic Enol Sci* **47**: 153-158.

Pellerin, P, Doco, T, Vidal, S, Williams, P, Brillouet, JM e Oneill, MA (1996), "Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II" *Carbohydrate Research* **290** (2): 183-197.

Pellerin, P, Vidal, S, Williams, P e Brillouet, JM (1995), "Characterization of 5 Type-Ii Arabinogalactan-Protein Fractions from Red Wine of Increasing Uronic-Acid Content" *Carbohydrate Research* **277** (1): 135-143.

Perez, S, Mazeau, K e du Penhoat, CH (2000), "The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides" *Plant Physiology and Biochemistry* **38** (1-2): 37-55.

Poncet-Legrand, C, Edelmann, A, Putaux, JL, Cartalade, D, Sarni-Manchado, P e Vernhet, A (2006), "Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio" *Food Hydrocolloids* **20** (5): 687-697.

Porto, P, Laranjinha, JAN e de Freitas, VAP (2003), "Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships" *Biochemical Pharmacology* **66** (6): 947-954.

Prasanna, V, Prabha, TN e Tharanathan, RN (2007), "Fruit ripening phenomena - An overview" *Critical reviews in food science and nutrition* **47** (1): 1-19.

Prinz, JF e Lucas, PW (2000), "Saliva tannin interactions" *Journal Of Oral Rehabilitation* **27** (11): 991-994.

Rawel, HA, Meidtner, K e Kroll, J (2005), "Binding of selected phenolic compounds to proteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (10): 4228-4235.

Redgwell, RJ, Fischer, M, Kendal, E e MacRae, EA (1997), "Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls" *Planta* **203** (2): 174-181.

Ribéreau-Gayon, P, Yves Glories, Alain Maujean e Dubourdieu, D (2004). *Traité d'œnologie, Tome 2: Chimie du vin. Stabilisation et traitements.*

Ricardo da silva, JM, Cheynier, V, Souquet, JM, Moutounet, M, Cabanis, JC e Bourzeix, M (1991), "Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **57** (1): 111-125.

Riou, V, Vernhet, A, Doco, T e Moutounet, M (2002), "Aggregation of grape seed tannins in model wine - effect of wine polysaccharides" *Food Hydrocolloids* **16** (1): 17-23.

Robinovitch, MR, Ashley, RL, Iversen, JM, Vigoren, EM, Oppenheim, FG e Lamkin, M (2001), "Parotid salivary basic proline-rich proteins inhibit HIV-I infectivity" *Oral Diseases* **7** (2): 86-93.

Robinson, R, Kauffman, DL, Waye, MMY, Blum, M, Bennick, A e Keller, PJ (1989), "Primary Structure And Possible Origin Of The Non-Glycosylated Basic Proline-Rich Protein Of Human Submandibular-Sublingual Saliva" *Biochemical Journal* **263** (2): 497-503.

Sabatini, LM, Warner, TF, Saitoh, E e Azen, EA (1989), "Tissue Distribution Of Rnas For Cystatins, Histatins, Statherin, And Proline-Rich Salivary Proteins In Humans And Macaques" *Journal Of Dental Research* **68** (7): 1138-1145.

Santos-Buelga, C e Scalbert, A (2000), "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health" *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** (7): 1094-1117.

Santos, NC, Fernandes, M e Castanho, M (1999), "Overcoming angular dependency when teaching light scattering using a spectrofluorometer: The molecular weights of latex beads" *Journal of Chemical Education* **76** (9): 1259-1259.

Sarni-Manchado, P e Cheynier, V (2002), "Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry" *Journal Of Mass Spectrometry* **37** (6): 609-616.

Sarni-Manchado, P, Cheynier, V e Moutounet, M (1999), "Interactions of grape seed tannins with salivary proteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1): 42-47.

Scalbert, A e Williamson, G (2000), "Dietary intake and bioavailability of polyphenols" *Journal Of Nutrition* **130** (8): 2073S-2085S.

Serafini, M, Maiani, G e FerroLuzzi, A (1997), "Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (8): 3148-3151.

Shimada, T (2006), "Salivary proteins as a defense against dietary tannins" *Journal of Chemical Ecology* **32** (6): 1149-1163.

Siebert, KJ (1999), "Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, Stabilization and analysis" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (2): 353-362.

Siebert, KJ (2006), "Haze formation in beverages" *Lwt-Food Science And Technology* **39** (9): 987-994.

Siebert, KJ e Lynn, PY (2000), "Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze particles" *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **58** (3): 117-123.

Siebert, KJ, Troukhanova, NV e Lynn, PY (1996), "Nature of polyphenol-protein interactions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44** (1): 80-85.

Simon, C, Barathieu, K, Laguerre, M, Schmitter, JM, Fouquet, E, Pianet, I e Dufourc, EJ (2003a), "Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach" *Biochemistry* **42** (35): 10385-10395.

Simon, C, Pianet, I e Dufourc, EJ (2003b), "Synthesis and circular dichroism study of the human salivary proline-rich protein IB7" *Journal Of Peptide Science* **9** (2): 125-131.

Singleton, VL e Esau, P (1969). *Phenolic Substances in Grape and Wine, and their significance*. New York, Academic Press.

Skopec, MM, Hagerman, AE e Karasov, WH (2004), "Do salivary proline-rich proteins counteract dietary hydrolyzable tannin in laboratory rats?" *Journal of Chemical Ecology* **30** (9): 1679-1692.

Somers, TC (1971), "Polymeric Nature Of Wine Pigments" *Phytochemistry* **10** (9): 2175-&.

Souquet, JM, Cheynier, V, Brossaud, F e Moutounet, M (1996), "Polymeric proanthocyanidins from grape skins" *Phytochemistry* **43** (2): 509-512.

Taira, S, Ono, M e Matsumoto, N (1997), "Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins" *Postharvest Biology And Technology* **12** (3): 265-271.

Troszynska, A, Amarowicz, R, Lamparski, G, Wolejszo, A e Barylko-Pikielna, N (2006), "Investigation of astringency of extracts obtained from selected tannins-rich legume seeds" *Food Quality and Preference* **17** (1-2): 31-35.

Valentova, H, Skrovankova, S, Panovska, Z e Pokorny, J (2002), "Time-intensity studies of astringent taste" *Food Chemistry* **78** (1): 29-37.

Veerman, ECI, vandenKeybus, PAM, Vissink, A e Amerongen, AVN (1996), "Human glandular salivas: Their separate collection and analysis" *European Journal Of Oral Sciences* **104** (4): 346-352.

Verbeken, D, Dierckx, S e Dewettinck, K (2003), "Exudate gums: occurrence, production, and applications" *Applied Microbiology And Biotechnology* **63** (1): 10-21.

Verge, S, Richard, T, Moreau, S, Richelme-David, S, Vercauteren, J, Prome, JC e Monti, JP (2002), "First observation of non-covalent complexes for a tannin- protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy" *Tetrahedron Letters* **43** (13): 2363-2366.

Vernhet, A, Pellerin, P, Belleville, MP, Planque, J e Moutounet, M (1999), "Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane" *American Journal of Enology and Viticulture* **50** (1): 51-56.

Vernhet, A, Pellerin, P, Prieur, C, Osmianski, J e Moutounet, M (1996), "Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions" *American Journal of Enology and Viticulture* **47** (1): 25-30.

Vidal, S, Courcoux, P, Francis, L, Kwiatkowski, M, Gawel, R, Williams, P, Waters, E e Cheynier, V (2004a), "Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception" *Food Quality and Preference* **15** (3): 209-217.

Vidal, S, Francis, L, Williams, P, Kwiatkowski, M, Gawel, R, Cheynier, W e Waters, E (2004b), "The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium" *Food Chemistry* **85** (4): 519-525.

Vidal, S, Williams, P, Doco, T, Moutounet, M e Pellerin, P (2003), "The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization" *Carbohydrate Polymers* **54** (4): 439-447.

Vincken, JP, Schols, HA, Oomen, R, McCann, MC, Ulvskov, P, Voragen, AGJ e Visser, RGF (2003), "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture" *Plant Physiology* **132** (4): 1781-1789.

Wakabayashi, K (2000), "Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening" *Journal Of Plant Research* **113** (1111): 231-237.

Walz, A, Stuhler, K, Wattenberg, A, Hawranke, E, Meyer, HE, Schmalz, G, Bluggel, M e Ruhl, S (2006), "Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis" *Proteomics* **6** (5): 1631-1639.

Waters, EJ, Pellerin, P e Brillouet, JM (1994), "A Saccharomyces Mannoprotein That Protects Wine from Protein Haze" *Carbohydrate Polymers* **23** (3): 185-191.

Willats, WGT, McCartney, L, Mackie, W e Knox, JP (2001), "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis" *Plant Molecular Biology* **47** (1-2): 9-27.

Wroblewski, K, Muhandiram, R, Chakrabartty, A e Bennick, A (2001), "The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds" *European Journal of Biochemistry* **268** (16): 4384-4397.

Yan, QY e Bennick, A (1995), "Identification Of Histatins As Tannin-Binding Proteins In Human Saliva" *Biochemical Journal* **311**: 341-347.

Zajacz, A, Gyemant, G, Vittori, N e Kandra, L (2007), "Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition" *Carbohydrate Research* **342** (5): 717.