



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Efeito de estímulos alimentares visuais no proteoma salivar

Érica Rodrigues Marques

Orientador(es) | Elsa Cristina Lamy
Fernando Capela e Silva

Évora 2023



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Efeito de estímulos alimentares visuais no proteoma salivar

Érica Rodrigues Marques

Orientador(es) | Elsa Cristina Lamy
Fernando Capela e Silva

Évora 2023





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

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | Célia Maria Antunes (Universidade de Évora) (Arguente)
Elsa Cristina Lamy (Universidade de Évora) (Orientador)

EFEITO DE ESTÍMULOS ALIMENTARES VISUAIS NO PROTEOMA SALIVAR

Érica Rodrigues Marques

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Orientador(es)

Doutora Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Professor Doutor Fernando Capela e Silva

Évora, abril 2023

Agradecimentos

Gostava de agradecer aos meus orientadores, Doutora Elsa Lamy e Professor Doutor Fernando Capela e Silva, pela oportunidade, pela simpatia, pela disponibilidade e por não me terem deixado desistir. Em particular à Doutora Elsa, pela dedicação e paixão pelo que faz, que contagiam e inspiram quem trabalha consigo.

Ao meu amigo, e talentoso *designer*, João Sousa, que realizou os cartazes para a divulgação do estudo. Ao Leonel Alegre, do Arteria Lab, que se disponibilizou para tirar as fotografias, e à empresa Dotesfera, que disponibilizaram os óculos para a realização do estudo, sem eles não teria sido possível a realização do presente trabalho.

À equipa do laboratório, Carla, Laura e Inês, que foram incansáveis, sempre dispostas a ajudar, ensinar e a aconselhar da melhor maneira. À minha companheira de bancada, colega e amiga, Ana Roque, com quem partilhei muitos bons momentos e a toda a gente com quem convivi durante o tempo que estagiei no laboratório.

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional e por me tornarem na pessoa que sou hoje. À minha tia São. Aos meus avós, que apesar de já não estarem presentes, espero que estejam muito orgulhosos do meu percurso, em especial à minha avó Flora, de quem tenho muitas saudades.

À minha mais recente “família”, Zé, Inês, Brito e Guerreiro, que tornaram a minha estadia em Évora mais especial. Aos meus amigos de sempre, Raquel, David, Ana Rita, Diogo e Carolina, que já não vão ter razões para reclamar que não tenho tempo para eles. Um especial obrigado à minha amiga Ana Sofia, por toda a ajuda e disponibilidade.

Por último, mas não menos importante, o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que não referi, mas que, de algum modo, contribuíram para a concretização desta dissertação.

Muito obrigada.

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas	x
Unidades	xii
Resumo	xiii
<i>Abstract</i>	xv
Capítulo 1 Problemática e Objetivos	1
1.1. Problemática.....	2
1.2. Objetivos	2
Capítulo 2 Fundamento Teórico	5
2.1. Introdução	6
2.2. Respostas de fase cefálica	6
2.2.1. Salivação como resposta de fase cefálica	9
2.3. Saliva	10
2.3.1. Secreção, composição e principais funções	10
2.3.2. Proteoma salivar.....	15
2.4. Saliva e alimentação.....	19
2.4.1. Alterações induzidas por estímulos pré-ingestivos.....	21
Capítulo 3 Metodologia Experimental	23
3.1. Ensaio	24
3.1.1. Participantes.....	24
3.1.2. Desenho experimental e recolha de saliva.....	24
3.1.3. Estímulos visuais	25
3.1.4. Questionários	26

3.1.4.1. Questionário acerca das sensações / emoções desencadeadas pelas imagens	26
3.1.4.2. Questionário de preferências alimentares e dados pessoais	26
3.2. Tratamento das amostras de saliva	27
3.3. Taxa de secreção salivar	27
3.4. Análise da composição da saliva	27
3.4.1. Quantificação proteica pelo método de Bradford	27
3.4.2. Análise do proteoma salivar	29
3.4.2.1. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)	29
3.4.2.2. Eletroforese bidimensional (2-DE)	30
3.5. Análise estatística	32
Capítulo 4 Resultados	35
4.1. Efeito da visualização das diferentes imagens na percepção de sensações / emoções	36
4.2. Efeito da visualização das diferentes imagens na salivação	39
4.2.1. Perfil proteico salivar obtido	39
4.2.2. Variação na salivação e perfil proteico induzido pela visualização das diferentes imagens	41
4.2.3. Variações na composição da saliva induzidas pela visualização, corrigidas para o efeito das imagens no “desejo de ingerir”	46
4.3. Relação entre as alterações na salivação ou perfil proteico salivar e as sensações / emoções desencadeadas pelas imagens	48
4.4. Efeito da visualização das imagens de alimentos no perfil eletroforético bidimensional	53
Capítulo 5 Discussão	57
Capítulo 6 Conclusão	65
Referências Bibliográficas	67
Anexos	77

Índice de Figuras

Figura 1: Posição anatômica das glândulas salivares maiores. 1-Glândula parótida (serosa); 2- Glândula submandibular (sero-mucosa); 3- Glândula sublingual (mucosa) (retirado e adaptado de Varga, 2012)	11
Figura 2: Estrutura de uma glândula salivar. 1 - Ácino; 2- ducto intercalado; 3- ducto estriado; 4- ducto excretor; 5- célula mioepitelial (retirado e adaptado de Varga, 2012).	12
Figura 3: Contribuições percentuais das diferentes glândulas salivares durante o fluxo não estimulado (Adaptado de Almeida <i>et al.</i> , 2008).....	13
Figura 4: Principais funções da saliva divididas de acordo com a superfície de atuação e contribuição das diferentes proteínas. CA – anidrase carbónica; DNase – desoxirribonuclease; PRG – glicoproteínas ricas em prolina; PRPs – proteínas ricas em prolina; RNase – ribonuclease; SLPI - inibidor de protease secretada por leucócitos; VEGh – proteína da glândula de Von Ebner’s humana (Retirado e adaptado de Amerongen & Veerman, 2002).....	15
Figura 5: Representação em percentagem das principais proteínas presentes na saliva humana. aPRPs – proteínas ricas em prolina ácidas; bPRPs – proteínas ricas em prolina básicas; gPRPs – proteínas ricas em prolina glicolisadas; IgG – imunoglobulina G; sIgA – imunoglobulina A secretora (Retirado e adaptado de Schulz <i>et al.</i> 2012).....	17
Figura 6: Desenho experimental e estímulos visuais apresentados. Todos os participantes foram expostos aos quatro estímulos. A - alimento palatável salgado tipo <i>fast-food</i> ; B - alimento palatável doce; C - alimento de baixa palatibilidade (saudável); D – estímulo não alimentar (controlo).	25
Figura 7: Exemplo de uma curva padrão de BSA usada para a determinação da concentração de proteína total das amostras.	28
Figura 8: Representação gráfica das intensidades percebidas das sensações para as quais se observaram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.	37
Figura 9: Imagem representativa de um gel SDS-PAGE com as bandas consideradas para análise. MW- Massas moleculares (kDa).....	40
Figura 10: Representação gráfica das taxas de secreção, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controlo).	42
Figura 11: Perfil 2-DE representativo das amostras de saliva mista. Os <i>spots</i> assinalados são aqueles para os quais se observaram diferenças entre estímulos visuais. MW – Massas moleculares (kDa); <i>pI</i> – ponto isoelétrico.	55

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais respostas de fase cefálica descritas na literatura, possíveis funções ou efeitos e respetiva localização (retirado e adaptado de Smeets <i>et al.</i> 2010).	8
Tabela 2: Sensações (média \pm desvio padrão) desencadeadas pela visualização das diferentes imagens de alimentos.....	36
Tabela 3: Dados de adequação do modelo de análise de componentes principais.	38
Tabela 4: Peso das diferentes variáveis para cada uma das componentes (rotação varimax).....	38
Tabela 5: Comparação entre as sensações (média \pm desvio padrão) desencadeadas pela visualização das diferentes imagens de alimentos, considerando a preferência por palatável como covariável.....	39
Tabela 6: Identificação das bandas proteicas de acordo com resultados obtidos em estudos realizados previamente para a saliva humana Carreira <i>et al.</i> , 2020).	40
Tabela 7: Comparação das taxas de secreção e concentração em proteína total (média \pm desvio padrão), entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controlo).....	43
Tabela 8: Alterações no perfil proteico induzidas pelas diferentes imagens (alimentares + controlo) e potencial efeito do tipo de imagem nessas alterações.	43
Tabela 9: Comparação dos níveis (% Volume) (média \pm desvio padrão) das bandas proteicas, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controlo).	45
Tabela 10: Comparação dos níveis (% Volume) (média \pm desvio padrão) das bandas proteicas, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens alimentares considerando o “desejo de ingerir” como variável.....	47
Tabela 11: Correlação entre as bandas proteicas e as sensações / emoções desencadeadas pela visualização das imagens alimentares.	48
Tabela 12: Peso das diferentes variáveis para cada uma das componentes (rotação varimax).....	51
Tabela 13: Correlação entre a variação no volume, concentração e nas bandas proteicas considerando “emoções positivas” e “emoções negativas” como variáveis.	52
Tabela 14: Valores de volume normalizado (média \pm desvio padrão) dos <i>spots</i> diferencialmente expressos na saliva secretada em resposta a diferentes estímulos visuais.	54

Tabela 15: Identificação de <i>spots</i> de acordo com estudos realizados anteriormente para a saliva humana.....	55
Tabela 16: Alterações no perfil proteico induzidas pelas diferentes imagens (alimentares + controlo) considerando o “desejo de ingerir” como covariável.	83

Lista de Abreviaturas

Δ	Variação;
ρ	Densidade;
2-DE	Eletroforese bidimensional (do inglês “ <i>Two-Dimensional gel Electrophoresis</i> ”);
aPRPs	Proteínas ricas em prolina ácidas (do inglês “ <i>acid proline-rich proteins</i> ”);
ANCOVA	Análise de covariância;
ANOVA	Análise de variância;
APS	Persulfato de amónio (do inglês “ <i>Ammonium persulfate</i> ”);
bPRPs	Proteínas ricas em prolina básicas (do inglês “ <i>basic proline-rich proteins</i> ”);
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”);
CA	Anidrase carbónica (do inglês “ <i>Carbonic Anhydrase</i> ”);
CBB	Azul brilhante de Comassie (do inglês “ <i>Coomassie Brilliant Blue</i> ”);
DNase	Desoxirribonuclease;
DTT	Ditiotreitol (do inglês “ <i>Dithiothreitol</i> ”);
ex.	Exemplo;
GLM	Modelo linear generalizado (do inglês “ <i>General Linear Model</i> ”);
gPRPs	Proteínas ricas em prolina glicosiladas (do inglês “ <i>glycosylated proline-rich protein</i> ”);
Ig	Imunoglobulina (do inglês “ <i>immunoglobulin</i> ”);
KMO	Kaiser-Meyer-Olkin;
MW	Massa molecular (do inglês “ <i>molecular weight</i> ”);
n.i.	Não identificado;
P	Valor de P (do inglês “ <i>p-value</i> ”);
PCA	Análise de componentes principais (do inglês “ <i>Principal Component Analysis</i> ”);
<i>pl</i>	Ponto isoelétrico;
PIP	Proteína induzida por prolactina (do inglês “ <i>Prolactin-induced protein</i> ”);
PRG	Glicoproteína rica em prolina (do inglês “ <i>proline-rich glycoprotein</i> ”);
PRPs	Proteínas ricas em prolina (do inglês “ <i>proline-rich protein</i> ”);
RFC	Respostas de Fase Cefálica;
RNAse	Ribonuclease;

RSFC	Resposta Salivar de Fase Cefálica;
RV	Realidade Virtual;
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”);
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês “ <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis</i> ”);
slgA	Imunoglobulina A secretora (do inglês “ <i>Secretory immunoglobulin A</i> ”);
SLPI	Inibidor de protease secretada por leucócitos (do inglês “ <i>Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor</i> ”);
SPLUNC	<i>Short-palate lung and nasal epithelium carcinoma associated protein 2</i> ;
TEMED	Tetrametiletilenodiamina (do inglês “ <i>Tetramethylethylenediamine</i> ”);
VEGh	Proteína da glândula de Von Ebner’s humana (do inglês “ <i>human von Ebner's gland protein</i> ”).

Unidades

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
kDa	Quilo-Dalton
g	Força centrífuga
μg	Micrograma
g	Gramma
Kg	Quilograma
h	Hora
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
m³	Metro cúbico
min	Minuto
(m/v)	(massa / volume)
nm	Nanómetro
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
(v/v)	(volume / volume)

Efeito de Estímulos Alimentares Visuais no Proteoma Salivar

Resumo

Os estímulos pré-ingestivos, como a visualização de um alimento, podem desencadear emoções e respostas a nível fisiológico, como a salivação. O objetivo deste trabalho é estudar a influência da exposição a diferentes estímulos visuais alimentares, no proteoma salivar, relacionando-as com as emoções desencadeadas. Para isso, os participantes foram expostos a três estímulos visuais alimentares (alimento palatável salgado *fast-food*, palatável doce e de baixa palatabilidade). Recolheu-se saliva mista, antes e durante o estímulo, e avaliaram-se as emoções despoletadas. Analisou-se a taxa de secreção salivar, concentração proteica e, através de eletroforese unidimensional e bidimensional, estudaram-se as alterações no proteoma salivar. Observou-se um aumento de anidrase carbónica VI associado à visualização do alimento doce, e de cistatinas, associado à visualização do alimento de baixa palatabilidade. Verificou-se, também, diminuição de cistatinas e aumento de proteínas induzida por prolactina, associados a emoções negativas, e aumento de amilase associado a emoções positivas.

Palavras-chave

Comportamento alimentar; estímulos pré-ingestivos; estímulos visuais; proteoma salivar; salivação; emoções.

Effect of Visual Food Stimuli on Salivary Proteome

Abstract

Pre-ingestive stimuli, such as the sight of food, can trigger emotions and physiological responses, such as salivation. The aim of this paper is to study the influence of exposure to different visual food stimuli, on the salivary proteome, and relate them to the emotions triggered. For this purpose, participants were exposed to three visual food stimuli (fast-food savory palatable food, sweet palatable food and low palatable food). Mixed saliva was collected, before and during the stimulus, and the triggered emotions were assessed. Salivary secretion rate, protein concentration and changes in the salivary proteome, by uni-dimensional and two-dimensional electrophoresis, were studied. An increase in carbonic anhydrase VI was observed, associated to the sight of sweet food, and in cystatines, associated to the sight of low palatability food. We also observed a decrease in cystatines and a increase in prolactin-induced protein associated with negative emotions, and an increase in amylase associated with positive emotions.

Key-words

Feeding behavior; pre-ingestive stimuli; visual stimuli; salivary proteome; salivation; emotions.

Capítulo 1 | **Problemática e Objetivos**

1.1. Problemática

A alimentação é uma experiência multissensorial e, em muitos casos, o primeiro contacto sensorial que temos com os alimentos, é através dos olhos. A simples visão de um alimento pode facilitar o desejo subjetivo de o ingerir, como também, ativar áreas cerebrais e vias neurais associadas à recompensa. Para além disso, a exposição a um alimento, e às suas propriedades sensoriais, pode proporcionar expectativas sobre a qualidade gustativa, o sabor e a palatabilidade do mesmo, afetando assim, a aceitação e o conseqüente consumo alimentar (Wadhera & Capaldi-Phillips, 2014).

São vários os autores que sugerem que as respostas às propriedades sensoriais dos alimentos, tais como a visão, são respostas condicionadas, ou seja, a exposição aos alimentos é, geralmente, seguida do consumo dos mesmos. Deste modo, as respostas que são necessárias para preparar o organismo para a ingestão, denominadas de respostas de fase cefálica, são acionadas quando o alimento é apenas percebido, ou seja, ainda antes do mesmo ser ingerido. As respostas de fase cefálica podem ser expressas, tanto fisiologicamente, por exemplo pelo aumento da salivação, como psicologicamente, pelo desejo auto-relatado (van der Waal *et al.*, 2021).

Um estudo anterior da equipa demonstrou que a exposição a estímulos pré-ingestivos, como o odor do pão, são suficientes para induzir alterações no proteoma salivar (Carreira *et al.*, 2020). Já no que diz respeito a estímulos visuais alimentares, estes estão pouco explorados, e que seja do nosso conhecimento, ainda não é conhecido o efeito que os mesmos podem apresentar na composição proteica da saliva.

1.2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é avaliar as alterações no proteoma salivar induzidas pela exposição a diferentes estímulos visuais alimentares, pertencentes a alimentos com diferentes palatabilidades, e relacioná-las com as sensações / emoções desencadeadas por esses mesmos estímulos. Mais especificamente, pretende-se responder às seguintes questões de investigação:

- A visualização de diferentes alimentos, associados a diferentes qualidades sensoriais (palatável salgado *fast-food*, palatável doce e baixa palatabilidade), desencadeia diferentes sensações / emoções?
- De que forma imagens de alimentos desencadeiam alterações na salivação, particularmente no perfil proteico salivar?

- Diferentes imagens alimentares, associadas a diferentes qualidades sensoriais, resultam, no mesmo efeito salivar, ou em efeitos diferentes?
- Os efeitos da visualização das imagens de alimentos, na salivação e na composição proteica da saliva, estão associados às sensações / emoções desencadeadas por esta?

Capítulo 2 | **Fundamento Teórico**

2.1. Introdução

Ao longo do dia, estamos continuamente expostos a estímulos alimentares e não alimentares que afetam o apetite, a percepção dos alimentos e, conseqüentemente, a ingestão. Estes estímulos podem ser de natureza diferente, como estímulos visuais, olfativos, auditivos, gustativos ou táteis. Na área da psicologia e das neurociências, têm sido realizados vários estudos no sentido de perceber como é que estes estímulos podem interagir e influenciar as escolhas alimentares e as quantidades de alimentos ingeridos.

Antes de iniciar a apresentação dos diferentes aspetos teóricos a serem considerados na presente dissertação, é importante definir dois conceitos: multissensorial e *cross-modal*. A estimulação multissensorial diz respeito à integração de sinais provenientes de diferentes classes sensoriais numa única percepção. Ou seja, de acordo com Stein, 2010, citado por Spence (2018): “*from the physiological perspective, integration refers to the creation of a true product (i.e. neural signal) derived from an interaction among two or more different sensory inputs. That integrated neural signal is different than each of the presumptive component responses and cannot readily be deconstructed to yield the unique contributions to its formation*”. Já no que diz respeito ao conceito *cross-modal*, este refere-se a situações em que um estímulo de uma determinada tipologia influencia (cria viés) a forma como outra tipologia sensorial é percebida. Por exemplo, uma situação em que uma música (auditivo) influencia a intensidade percebida de doce (gustativo), num alimento (ex. Guedes *et al.*, 2023) é um exemplo de efeito *cross-modal*.

Seja por efeito multissensorial, seja por efeito *cross-modal*, os sentidos são fundamentais na forma como percebemos os alimentos, assim como na forma como isso se traduz no consumo e nos efeitos provocados pelos mesmos. Desta forma saber e perceber como diferentes tipologias de estímulos influenciam aspetos fisiológicos e comportamentais associados à alimentação, é de extrema relevância.

2.2. Respostas de fase cefálica

A fase cefálica é considerada a primeira fase da digestão (Lasschuijt *et al.*, 2020). Esta é caracterizada por um conjunto de respostas fisiológicas, endócrinas e autónomas do sistema digestivo que ocorrem em antecipação à ingestão de um alimento e a que denominamos de respostas de fase cefálica (RFC) (Zafra *et al.*, 2006).

O conceito foi introduzido no início do século XX, pelas conhecidas experiências realizadas em cães de Ivan Pavlov (Pavlov, 1910). Embora, inicialmente, este tenha introduzido o termo “secreções psíquicas”, autores posteriores concordaram em utilizar a designação RFC (**R**espostas de **F**ase **C**efálica), devido a estas respostas serem, essencialmente, mediadas por mecanismos cerebrais e pelo sistema nervoso periférico (Zafra *et al.*, 2006).

As RFC são respostas reflexas, geralmente mediadas pelo nervo vago, e são desencadeadas pela exposição às propriedades sensoriais dos alimentos, como a visão, o cheiro, o sabor, ou até pela simples ideia de os ingerir. Assim, estas respostas podem ser o resultado direto de estimulação sensorial, mas também podem resultar de um processo condicionado, ou seja, quando um indivíduo aprende que determinado estímulo prevê a ingestão de alimentos, as RFC são desencadeadas pela exposição a esse mesmo estímulo (Nederkoorn *et al.*, 2000). Foi sugerido que quanto maior a complexidade do estímulo, maior é a resposta gerada. Deste modo, parecem existir estímulos que produzem respostas maiores que, segundo Mattes (1997), podem ser hierarquizados pela seguinte ordem: mastigação e deglutição > gosto > olfato > visão ou som > sinais cognitivos.

As respostas aos estímulos cefálicos, ou estímulos pré-ingestivos, podem ser explicadas pelo conceito de *alostasia*, o processo pelo qual o organismo reage a novas situações (físicas, ambientais, entre outras) de modo a restabelecer a homeostasia (Skvortsova *et al.*, 2021). Assim, a principal função destas alterações antecipatórias é minimizar as perturbações do meio interno resultantes da ingestão de alimentos, preparando o organismo para a ingestão, digestão e absorção dos mesmos, contribuindo assim, para a manutenção da homeostase (Smeets *et al.*, 2010). Ao preparar o organismo para processar os nutrientes de modo mais eficiente, as RFC, permitem uma maior ingestão de alimentos, um menor tempo entre refeições e, portanto, aumenta a quantidade de nutrientes que pode ser recebida (Skvortsova *et al.*, 2021). Para além disso, também existem evidências de que estas desempenham um papel importante quer no aumento do apetite, quer na indução da saciedade (Power & Schulkin, 2008; Skvortsova *et al.*, 2021).

Desde as descobertas iniciais, o conceito pouco alterou, no entanto, a lista de respostas tem continuado a expandir-se. As RFC mais descritas na literatura incluem o aumento da salivação, motilidade e esvaziamento gástrico, termogénese, e a secreção de hormonas como a insulina, leptina e grelina (Skvortsova *et al.*, 2021). Mais respostas podem ser encontradas na tabela 1.

Tabela 1: Principais respostas de fase cefálica descritas na literatura, possíveis funções ou efeitos e respetiva localização (retirado e adaptado de Smeets *et al.* 2010).

	Respostas de fase cefálica (RFC)	Possíveis funções ou efeitos	Localização
Respostas secretoras	Saliva	Dissolve as partículas dos alimentos para serem transportadas para as papilas gustativas (essencial para a perceção do paladar); inicia a decomposição do amido e das gorduras.	Cavidade Oral
	Ácido clorídrico	Fragmentação dos alimentos.	Estômago
	Gastrina	Contribui para a secreção de ácido gástrico.	
	Enzimas digestivas (Lipase)	Atua no processo de digestão das gorduras.	
	Imunoglobulinas	Protegem as mucosas gástricas e intestinais contra microrganismos ingeridos juntamente com os alimentos.	
	Leptina	Atrasa o esvaziamento gástrico; envolvida nas secreções pancreáticas mediadas pela colecistocinina.	
	Grelina	Contribui para a fome. Aumento pré-prandial e decréscimo pós-prandial.	Duodeno
	Bicarbonato	Neutraliza o ácido gástrico.	
	Colecistocinina	Estimula a secreção enzimática pancreática; pode estimular a resposta motora gástrica; atrasa o esvaziamento gástrico.	Pâncreas
	Bicarbonato	Neutraliza os conteúdos ácidos provenientes do duodeno.	
	Enzimas digestivas (lipase, amílase, tripsina, quimotripsina)	Atuam no processo de digestão de gorduras, carboidratos e proteínas.	
	Insulina	Ajuda na homeostase da glucose e promove a absorção de aminoácidos.	
	Glucagon	Pode prevenir a hipoglicémia quando alimentos ricos em proteínas são consumidos; pode contrabalançar o aumento de insulina de fase cefálica; possível papel na termogénese.	
	Polipéptido pancreático	Inibe a secreção pancreática; pode atrasar o esvaziamento gástrico; diminui a ingestão de alimentos.	
Respostas não-secretoras	Atividade motora gástrica	Auxilia no esvaziamento gástrico.	
	Termogénese pós-prandial	Resulta do aumento da taxa metabólica. Função pouco clara.	
	Quociente respiratório	Reflete o substrato (gordura/hidratos de carbono/proteína) utilizado para a produção de energia.	
	Frequência cardíaca	Indica excitação/atividade simpática, incluindo atividade do nervo vago.	
	Pressão sanguínea	Pode refletir excitação.	

A alimentação falsa modificada (*modified sham feeding*) é uma técnica não-invasiva que nos permite estudar processos relacionados com as RFC em humanos. Esta foi desenvolvida a partir da técnica de alimentação falsa (*sham feeding*) usada em animais, onde os alimentos são ingeridos normalmente, mas são, posteriormente, desviados por cateteres gástricos ou esofágicos para que não se acumulem na cavidade gástrica. Já na variante modificada, também denominada de técnica “mastigar e cuspir”, os alimentos são apenas provados, mas não engolidos. Deste modo, os recetores faríngeos e esofágicos não são estimulados e, assim, é possível, isolar a fase cefálica das fases subsequentes, permitindo avaliar a sua participação nos eventos digestivos (Zafra *et al.*, 2006).

A relevância das RFC tornam-se evidentes quando as mesmas estão ausentes, por exemplo, quando os alimentos são diretamente administrados na cavidade gástrica ou noutros segmentos do trato digestivo (Zafra *et al.*, 2006). Pavlov foi novamente um dos primeiros autores a documentar as alterações induzidas pela remoção da fase cefálica demonstrando que, sem esta, a digestão dos alimentos é prolongada. Também foi demonstrado por Yamashita *et al.* (1993) que a lipólise é desacelerada, o que pode levar a um aumento do peso corporal (Skvortsova *et al.*, 2021).

2.2.1. Salivação como resposta de fase cefálica

Os estímulos sensoriais dos alimentos podem induzir uma libertação rápida de saliva na cavidade oral a que designamos de resposta salivar de fase cefálica (RSFC) (Morquecho-Campos *et al.*, 2020). A saliva é a primeira secreção como resposta de fase cefálica e, devido às suas propriedades, é de grande importância para a digestão (Zafra *et al.*, 2006).

Contrariamente às restantes RFC, que são mediadas pelo nervo vago, a resposta salivar resulta de uma interação entre os sistemas simpático e parassimpático. A estimulação parassimpática, influência predominante sob condições de alimentação, aumenta o fluxo sanguíneo para as glândulas e a produção de saliva pelas células acinares. Já a estimulação simpática é responsável pela modulação da composição salivar, especialmente do conteúdo proteico (Mattes, 2000).

Como já foi referido, o famoso cientista russo Ivan Pavlov foi um dos primeiros a estudar as RFC. Para Pavlov, as secreções salivares eram secreções digestivas, servindo a mesma função intrínseca que as secreções gástricas e intestinais, ou seja, permitir ao animal utilizar os alimentos para as necessidades corporais. De entre muitas

descobertas, este demonstrou que a salivação ocorria em antecipação à alimentação (Power & Schulkin, 2008). Mais tarde, sob a orientação de Pavlov, Vul'fson demonstrou que a salivação variava de acordo com os alimentos ingeridos. Como por exemplo, a ingestão de alimentos secos estimulava uma maior salivação do que a ingestão de alimentos húmidos (Windholz, 1986).

A magnitude da RSFC é determinada, em parte, pelas propriedades físicas e químicas específicas dos alimentos. A secreção de saliva é mais influenciada pela qualidade de um estímulo gustativo do que pela sua palatabilidade. Por exemplo, a fim de proteger a mucosa oral, uma substância ácida estimula uma maior libertação de saliva, comparativamente a um alimento apetitoso. Do mesmo modo, foi demonstrado que macronutrientes específicos presentes nos alimentos influenciam a composição enzimática e não o volume salivar. Como por exemplo, foi observado que a sacarose e a frutose estimulam a libertação de saliva especialmente rica em amilase (Pedersen *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2006).

A RSFC tem vindo a ser utilizada como um diagnóstico objetivo ou um índice preditivo para vários estados ou condições clínicas atualmente identificáveis apenas por medidas subjetivas (Mattes, 2000). Alguns estudos sugerem que a salivação é um marcador fisiológico válido para o apetite (ex. Keesman *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2021). A principal vantagem do uso desta resposta na avaliação da fome, comparativamente às medidas de auto-relato, é que, apesar da resposta salivar também possuir uma componente voluntária, é mais dificilmente manipulada, uma vez que as propriedades sensoriais dos alimentos desencadeiam inevitavelmente respostas corporais (Naumann *et al.*, 2013).

2.3. Saliva

2.3.1. Secreção, composição e principais funções

A saliva é uma secreção mucosa exócrina transparente, ligeiramente ácida, sintetizada e segregada pelas glândulas salivares, as quais são inervadas pelo sistema nervoso autónomo, mais especificamente pelos nervos simpáticos e parassimpáticos (Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019). De acordo com o seu tamanho anatómico e ao volume de saliva que produzem, as glândulas salivares podem ser classificadas em maiores e menores. As glândulas salivares maiores encontram-se em pares bilaterais e incluem as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais

(Figura 1). Já as glândulas salivares menores, estão distribuídas em grupos constituídos por centenas de glândulas na mucosa do trato digestivo superior (Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020). As glândulas salivares também podem ser classificadas de acordo com a natureza histoquímica da secreção que produzem, podendo ser serosa, mucosa ou sero-mucosa, também denominada de mista (Benn *et al.*, 2014).

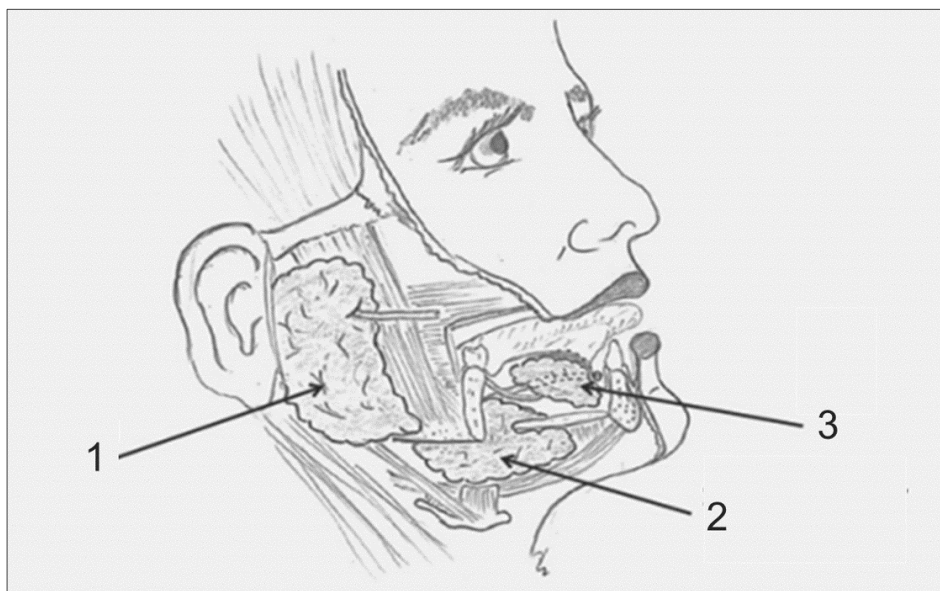


Figura 1: Posição anômica das glândulas salivares maiores. 1-Glândula parótida (serosa); 2- Glândula submandibular (sero-mucosa); 3- Glândula sublingual (mucosa) (retirado e adaptado de Varga, 2012)

As glândulas salivares são compostas pelas células acinares, células mioepiteliais e por várias células do sistema de ductos (Figura 2). As células acinares são responsáveis por determinar o tipo de secreção produzida a partir das diferentes glândulas, pela produção do fluido salivar e também da maioria das proteínas salivares. O sistema de ductos é formado pelos ductos intercalados e ductos estriados, que modificam o fluido salivar (que passa de isotônico a hipotônico, conforme detalhado adiante), e pelos ductos excretores que recolhem a saliva e a transportam para a cavidade oral. O sistema de ductos ramificados termina em aglomerados de células acinares, denominados de ácidos. As células mioepiteliais auxiliam no processo de secreção, contraindo os ácidos e ajudando a libertar o fluido neles acumulado (Benn *et al.*, 2014; Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020; Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019).

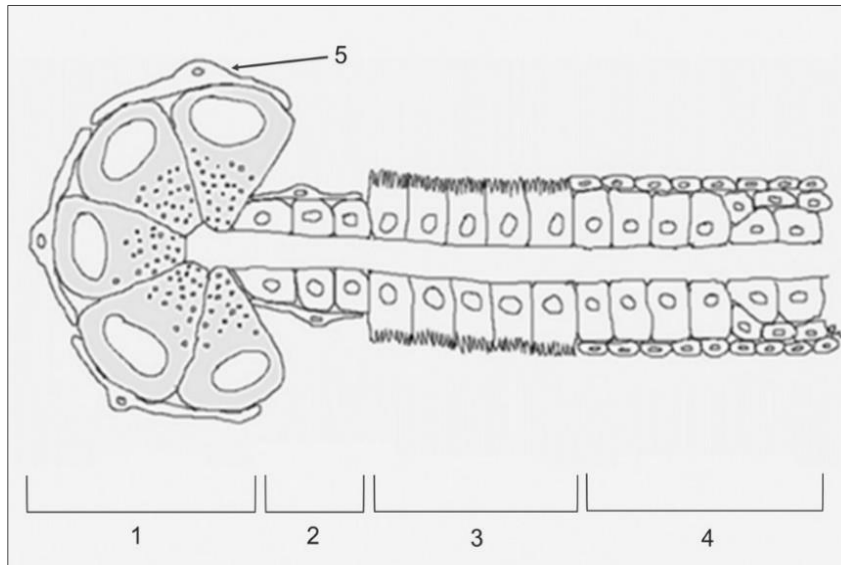


Figura 2: Estrutura de uma glândula salivar. 1 - Ácino; 2- ducto intercalado; 3- ducto estriado; 4- ducto excretor; 5- célula mioepitelial (retirado e adaptado de Varga, 2012).

A produção de saliva ocorre, essencialmente, em duas fases. A primeira fase ocorre nas células acinares, onde se dá a secreção ativa de sódio e cloreto, dando origem a um gradiente osmótico que leva ao transporte passivo de água para o lúmen acinar. Desta primeira fase, resulta uma secreção primária isotônica. A segunda fase consiste na modificação do fluido dentro da região ductal. Nesta fase, os ductos, que são impermeáveis à água, modificam o líquido removendo o sódio e o cloreto e adicionando potássio e bicarbonato. Assim, o líquido isotônico primário transforma-se em saliva hipotônica (Roblegg *et al.*, 2019; Rodrigues, 2017). Esta saliva atinge a cavidade oral onde é misturada com o fluido crevicular gengival, secreções nasais e brônquicas, derivados do sangue, células provenientes da descamação do epitélio, microrganismos e detritos alimentares (Sivadasan *et al.*, 2015). Deste modo, forma-se uma mistura complexa a que denominamos de saliva total, saliva mista ou fluido oral (Fábián *et al.*, 2015).

A saliva total é constituída principalmente por água (99,5%), proteínas (0,3%) e substâncias inorgânicas (0,2%). A componente proteica é constituída por glicoproteínas, como mucinas, e enzimas, como α -amilase e a anidrase carbônica VI (CA VI). Também é composta por imunoglobulinas e uma vasta gama de péptidos, como histatinas, estaterinas, cistatinas e proteínas ricas em prolina (PRPs), estas, que podem ser classificadas como ácidas (aPRPs), básicas (bPRPs) e glicosiladas (gPRPs). A fração inorgânica da saliva contém vários eletrólitos, como bicarbonato, cálcio, fosfatos, sódio, potássio e magnésio, e produtos nitrogenados, como amônia e ureia (Castagnola *et al.*,

2011; Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020; Schipper *et al.*, 2007). A velocidade com que a saliva passa através da região ductal, determinará a concentração de eletrólitos, ou seja, quanto maior for a velocidade, menor será o tempo para que se realizem os processos de troca, e menor será a concentração de eletrólitos (Aps & Martens, 2005).

A composição da saliva depende fortemente da taxa de secreção, e esta, por sua vez, é muito individualizada (Roblegg *et al.*, 2019). Em média, um adulto saudável produz diariamente entre 500 e 1000 mL de saliva (Aps & Martens, 2005). Relativamente à taxa de secreção, em condições de repouso, ou seja, sem estimulação, os valores relatados na literatura variam entre 0,1 e 0,4 mL/min. Já em condições de estimulação, os valores variam entre 0,2 e 1,7 mL/min. As glândulas salivares apresentam diferentes contribuições para o fluxo salivar, tanto em condições de repouso como quando estimulado. Na figura 3 podemos observar as contribuições percentuais das diferentes glândulas em condições de repouso. Contudo, quando o fluxo é estimulado, as glândulas parótidas aumentam a sua contribuição cerca de 50 a 70%, tornando-se as principais responsáveis pelo fluxo salivar total nestas condições (Benn *et al.*, 2014).

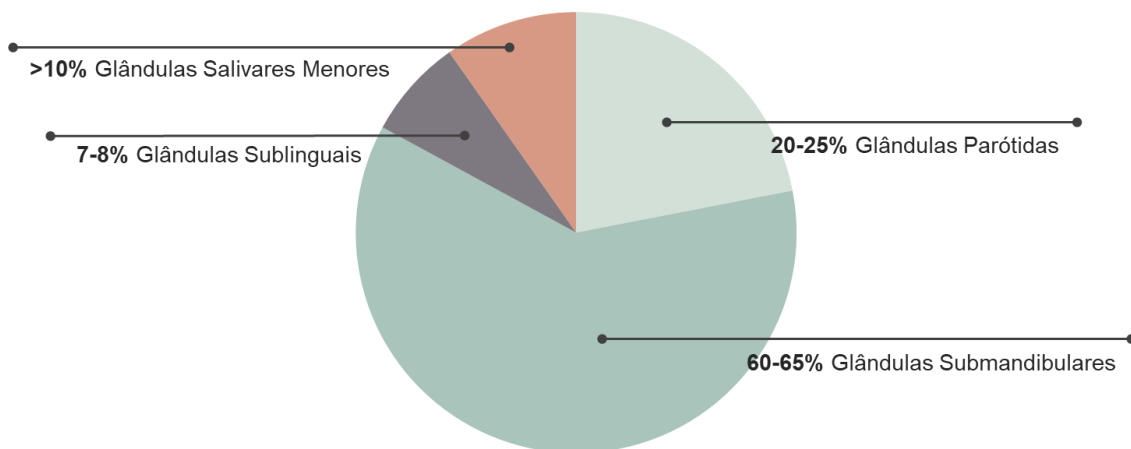


Figura 3: Contribuições percentuais das diferentes glândulas salivares durante o fluxo não estimulado (Adaptado de Almeida *et al.*, 2008).

Para além das diferentes contribuições no fluxo salivar, também existem grandes diferenças entre as glândulas quanto às proteínas que sintetizam. As glândulas parótidas secretam uma secreção serosa, rica em α -amílase, aPRPs, bPRPs e estaterinas. As aPRPs são comuns tanto às glândulas parótidas como às submandibulares, já as bPRPs parecem ser exclusivas das glândulas parótidas. A

secreção mucosa produzida pelas glândulas sublinguais é composta por mucinas e altos níveis de lisozimas. Já as glândulas submandibulares, produzem uma secreção sero-mucosa que também contém mucinas, e uma elevada quantidade de cistatinas. À semelhança da glândula parótida, as glândulas submandibulares e sublinguais também expressam amilase, mas em quantidades muito reduzidas. A imunoglobulina A (IgA) é o principal anticorpo presente na saliva e também é universal a todas as glândulas (Benn *et al.*, 2014; Carpenter, 2013; Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020; Humphrey & Williamson, 2001; Pink *et al.*, 2009).

Tanto o volume como a composição do fluido oral variam muito entre indivíduos, e no mesmo indivíduo, em diferentes momentos do dia (de Almeida *et al.*, 2008). Estes podem ser influenciados por fatores como o sexo do indivíduo, a idade, o grau de hidratação, o peso corporal ou o ritmo circadiano, este, que pode afetar o fluxo salivar com variações que podem atingir até 50%. Para além disso, também podem ser influenciados por outras condições, tais como, o uso de medicação, o exercício físico ou o stress (Benn *et al.*, 2014; Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020).

A saliva mista é uma secreção cujo pH varia entre 6 e 7 e que possui propriedades únicas de retenção de água e lubrificação. A sua densidade é comparável à da água ($\rho \sim 1000 \text{ kg/m}^3$), mas contrariamente a esta, que é um fluido newtoniano, a saliva é classificada como um fluido não newtoniano, porque a sua viscosidade diminui com o aumento do cisalhamento (Carpenter, 2013; Sarkar *et al.*, 2019). É um fluido complexo e versátil, que suprime uma grande variedade de necessidades fisiológicas como podemos observar na figura 4 (Lima *et al.*, 2010). É ainda de ressaltar que os componentes salivares, especialmente as proteínas, são multifuncionais e redundantes, ou seja, executam mais de uma função, e executam funções semelhantes, mas com diferentes extensões (Humphrey & Williamson, 2001).

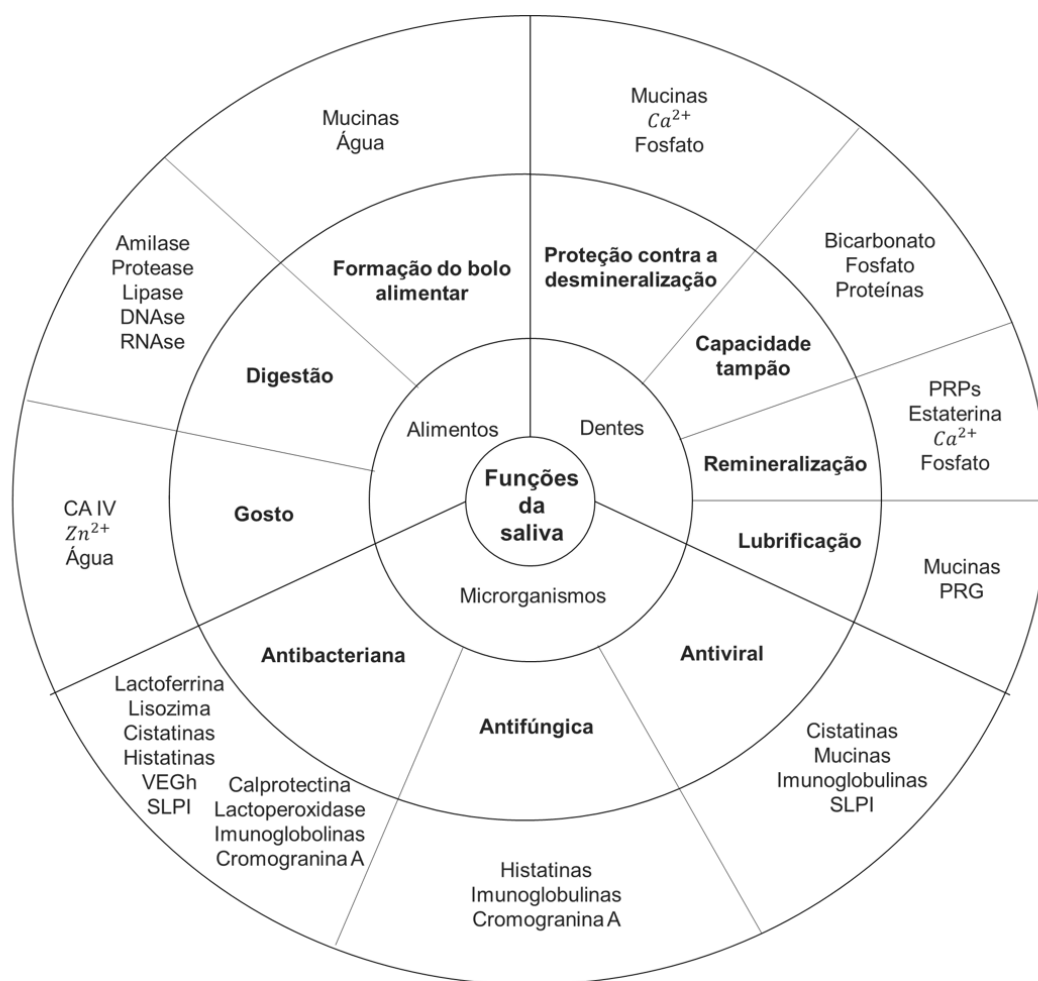


Figura 4: Principais funções da saliva divididas de acordo com a superfície de atuação e contribuição das diferentes proteínas. CA – anidrase carbónica; DNase – desoxirribonuclease; PRG – glicoproteínas ricas em prolina; PRPs – proteínas ricas em prolina; RNase – ribonuclease; SLPI - inibidor de protease secretada por leucócitos; VEGh – proteína da glândula de Von Ebner’s humana (Retirado e adaptado de Amerongen & Veerman, 2002).

2.3.2. Proteoma salivar

O termo proteoma, resultante da contração das palavras “proteína” e “genoma”, segundo Wilkins *et al.* (1996), consiste no conjunto de proteínas codificadas por um dado genoma, célula ou tipo de tecido. Contudo, o proteoma não resulta apenas da soma dos produtos traduzidos a partir de sequências genómicas, mas inclui também proteínas resultantes de modificações pós-transcrição e pós-tradução, como fosforilações, glicosilações e proteólise, que podem ser determinantes para a função das proteínas (Barbosa *et al.*, 2012; Lamy *et al.*, 2007). Assim, a proteômica não deve ser vista apenas como uma abordagem para estudar todas as proteínas expressas num organismo, mas também, deve ser vista, como uma ferramenta para melhor compreender as alterações que ocorrem na estrutura proteica, e de como estas se

refletem na interação com outras proteínas. E, numa última análise, de como estas alterações se podem traduzir na saúde ou doença de um organismo (Amado *et al.*, 2013). Para além da grande complexidade, o proteoma é dinâmico e o seu perfil altera quando exposto a diferentes condições, tais como alterações fisiológicas ou diferentes fases do ciclo celular (Barbosa *et al.*, 2012; Esteves *et al.*, 2019).

Uma das técnicas mais frequentemente utilizada para o estudo do proteoma é a eletroforese bidimensional (2-DE) combinada com a sua posterior identificação, através de métodos de espectrometria de massa (Lamy *et al.*, 2007). A 2-DE foi descrita em 1975 (O'farrells, 1975) e o seu princípio consiste na separação das proteínas com base em duas propriedades, o ponto isoelétrico e a massa molecular. Para isso, as proteínas são submetidas à técnica de focagem isoelétrica seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Ao combinar dois processos distintos de separação, esta técnica, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (Júnior *et al.*, 2013). Para além disso, ainda permite o mapeamento de diferentes isoformas resultantes de modificações pós-tradução, permitindo a sua quantificação separada (Rodrigues, 2017). Contudo, também apresenta algumas limitações, tais como uma resolução limitada para proteínas com massas moleculares muito altas ou muito baixas, proteínas altamente ácidas ou básicas, proteínas muito hidrofóbicas ou proteínas em baixa abundância (Schipper *et al.*, 2007).

A proteómica é amplamente utilizada para analisar fluidos corporais, como a saliva (Esteves *et al.*, 2019). O interesse por este fluido tem aumentado devido à sua fácil obtenção. A recolha de saliva é indolor e minimamente invasiva, características estas, que a tornam ideal para aplicar a populações mais sensíveis, como crianças e idosos (Aps & Martens, 2005). Para além disso, é económica e o seu armazenamento é relativamente fácil (Benn *et al.*, 2014). A saliva tem vindo a ser cada vez mais explorada como meio de diagnóstico e monitorização (Aps & Martens, 2005). Já foram identificadas diferenças nos perfis proteicos associadas a várias doenças sistémicas, tais como cancro da mama, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus e fibrose cística, e também a várias patologias orais, como o cancro oral, cárie dentária e periodontite (Gonçalves *et al.*, 2010; Javaid *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2016).

Nos últimos anos notou-se um grande progresso na divulgação do proteoma salivar. Estudos realizados anteriormente, indicam a presença de mais de 3000 proteínas diferentes já identificadas (Amado *et al.*, 2013). Estas proteínas podem ser sintetizadas pelas glândulas salivares ou podem ser comuns a outros fluidos biológicos (Castagnola *et al.*, 2011). Por exemplo, cerca de 27% das proteínas presentes na saliva são comuns ao plasma (Franco-Martínez *et al.*, 2020). A figura 5 ilustra as principais proteínas presentes na saliva humana.

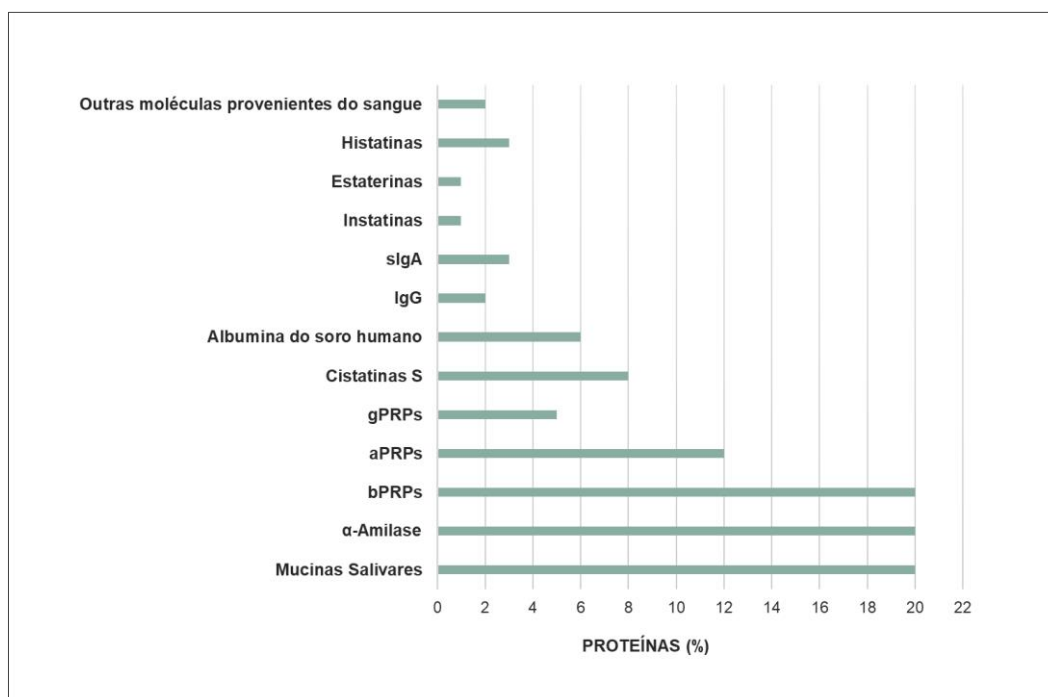


Figura 5: Representação em percentagem das principais proteínas presentes na saliva humana. aPRPs – proteínas ricas em prolina ácidas; bPRPs – proteínas ricas em prolina básicas; gPRPs – proteínas ricas em prolina glicolisadas; IgG – imunoglobulina G; slgA – imunoglobulina A secretora (Retirado e adaptado de Schulz *et al.* 2012).

As mucinas são glicoproteínas que contribuem significativamente para o comportamento viscoelástico da saliva (Carpenter, 2013; Sarkar *et al.*, 2019). Existem dois principais tipos presentes na saliva humana, MG1 e MG2. A mucina salivar MG1 é fortemente glicosilada, cerca de 80% do seu peso provém de hidratos de carbono, sendo por isso capaz de formar gel e possui uma massa molecular superior a 1000 kDa. Já a MG2, possui uma massa molecular menor, de aproximadamente 200 a 300 kDa e, não tendo uma propriedade gelificante tão forte, apresenta glicosilação menos heterogênea (Contreras-Aguilar & Gómez-García, 2020; Sarkar *et al.*, 2019). As mucinas são os principais compostos lubrificantes da saliva, facilitando a mastigação, deglutição e até a fala. Para além disso, também possuem um papel importante como agentes antivirais e na manutenção da integridade dos dentes.

A α -amilase, outra das proteínas mais abundantes na saliva, é responsável por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4, e assim, iniciar a digestão do amido na cavidade oral (Carpenter, 2013). As amilases salivares são compostas por duas famílias de isoenzimas, designadas família A e família B. A família A é composta por três isoenzimas, 1, 3 e 5, que apresentam uma massa molecular de cerca de 63 kDa e são N-glicosiladas. A família B também é composta por três isoenzimas, 2,4 e 6, e apresentam uma massa molecular de cerca de 59 kDa e não são glicosiladas (Oppenheim *et al.*, 2007).

Outras proteínas presentes na saliva humana, que são produtos da síntese proteica nas glândulas salivares são as PRPs, as cistatinas, estaterinas e histatinas. As PRPs são altamente polimórficas e possuem um importante papel na remineralização (Carpenter, 2013). As cistatinas são proteínas ricas em cisteína e são importantes agentes antivirais. Estas, podem ser de origem salivar, como a S, S1, S2, SA e SN, ou podem ser comuns a outros biofluidos, como a C e D (Carpenter, 2013; Scarano *et al.*, 2010). As estaterinas são proteínas de baixa massa molecular e, sendo o componente mais tensioativo da saliva, são importantes para as suas propriedades físicas. São também importantes na inibição da precipitação do fosfato de cálcio, função esta, que é altamente relevante para a capacidade de remineralização da saliva humana (Carpenter, 2013; Oppenheim *et al.*, 2007). As histatinas são uma das proteínas mais pequenas presentes na secreção salivar, apresentando uma massa molecular de cerca de 3 a 5 kDa. São básicas, ricas em histidina e segregadas tanto pela glândula parótida como pela submandibular. As histatinas 1, 3, e 5, representam cerca de 80% de todas as histatinas presentes nas secreções glandulares. Estas possuem importantes atividades antifúngicas e antibacterianas (Carpenter, 2013; Dodds *et al.*, 2005; Oppenheim *et al.*, 2007).

A componente imunológica da saliva é composta por diferentes classes de imunoglobulinas como IgA, IgG e IgM, sendo a IgA na sua forma secretora (sIgA) a predominante (Varga, 2012). Funcionalmente, as imunoglobulinas são importantes agentes antimicrobianos, antifúngicos e antivirais.

A análise do proteoma salivar pode ser desafiante, principalmente devido ao seu comportamento dinâmico e à variabilidade inter e intra-individual existente. As proteínas salivares são altamente polimórficas e sofrem extensas modificações pós-tradução, tal como foi referido anteriormente (Castagnola *et al.*, 2011). Para além disso, a presença de várias proteínas em grandes quantidades, pode dificultar a identificação e quantificação de proteínas que se encontram em menores quantidades e que podem

servir como potenciais biomarcadores. Para este caso, existem vários métodos de remoção dessas proteínas (ex. precipitação por diferentes métodos diferenciais, separação através de colunas com afinidade específica para proteínas de interesse, etc.), embora possam ocorrer inconvenientes, como a possível alteração de outros componentes salivares (Franco-Martínez *et al.*, 2020).

2.4. Saliva e alimentação

A saliva possui um papel muito importante na percepção sensorial dos alimentos, e esta, é determinante para as escolhas alimentares. É evidente de que o sabor é um dos principais impulsionadores das preferências alimentares, no entanto, a intensidade com que cada característica sensorial é percebida varia entre indivíduos, ou seja, o mesmo estímulo gustativo pode ser percebido como muito intenso por um indivíduo, e menos intenso por outro. O facto de percebermos um alimento, com mais, ou menos intensidade, vai afetar a nossa aceitação, e conseqüentemente, as nossas escolhas e hábitos alimentares (Lamy, 2022). Nos últimos anos, surgiram diversos estudos que sugerem que a saliva é um dos principais contribuintes, não só para o paladar, como também para a percepção do aroma e da textura (Lamy *et al.*, 2020).

Algumas proteínas salivares parecem estar associadas à sensibilidade individual com que os paladares básicos são percebidos. O paladar amargo é dos mais estudados e proteínas como a anidrase carbónica VI (CA VI, também denominada de gustina), cistatinas e PRPs têm sido relacionadas com a intensidade da percepção deste paladar (Cabras *et al.*, 2012; Dsamou *et al.*, 2012). Mais recentemente, foi analisada a relação entre a composição da saliva e a percepção do paladar doce (Rodrigues *et al.*, 2017b). O estudo demonstrou que a α -amílase está negativamente associada com a sensibilidade pelo paladar doce. Curiosamente, no mesmo estudo, também foi sugerido um papel da CA VI e das cistatinas (proteínas previamente associadas ao paladar amargo) na sensibilidade por este paladar básico.

A adstringência é a sensação de secura e aspereza associada a algumas bebidas e alimentos como o vinho tinto, o chá, e algumas frutas verdes. Esta é considerada uma sensação tátil, e não um paladar básico, e resulta principalmente da interação de compostos presentes nos alimentos, como os polifenóis, principalmente taninos, com as proteínas salivares (Lamy *et al.*, 2020). As principais proteínas associadas a esta sensação são as PRPs, sendo que proteínas como as histatinas, cistatinas e α -amílase também já foram associadas à adstringência (Dinnella *et al.*, 2010).

A avaliação da textura é um dos fatores mais importantes na apreciação dos alimentos e também pode ser influenciada pela composição salivar (Lamy *et al.*, 2020). Foi demonstrado que, diferentes níveis de α -amilase, entre diferentes indivíduos, parecem ser responsáveis pela variação na percepção da textura de alimentos que contêm amido (De Wijk *et al.*, 2004). Também foi demonstrado que as mucinas induzem a floculação de emulsões, e podem, assim, também afetar a maneira de como os indivíduos percebem os atributos de textura dos alimentos (Lamy *et al.*, 2020; Mosca & Chen, 2017).

Para além das sensações de paladar e textura, acima referidas, o aroma também parece estar associado à composição da saliva, podendo a sua percepção ser influenciada por esta. Quando mastigamos um alimento, são libertados compostos voláteis, que migram da cavidade oral para os recetores olfativos, por via retronasal. Estes compostos alimentares (voláteis) são misturados com a saliva e é, neste ponto, que pode haver interação entre eles e as proteínas salivares, podendo haver alteração das próprias moléculas voláteis (ou seja, da sua estrutura química), ou alteração da forma como estas se deslocam até ao local de deteção, influenciando assim, a percepção do aroma (Lamy *et al.*, 2020; Lamy, 2022). Por exemplo, foi demonstrado que tanto α -amilase como as mucinas possuem a capacidade de reter moléculas do aroma e assim alterar a percepção do mesmo (Pagès-Hélary *et al.*, 2014). De acordo com Criado *et al.* (2019), o fluxo salivar também influencia a percepção do aroma e, este, parece ter um efeito maior na percepção imediata do que na percepção de longa duração. Isto parece acontecer mais em aromas provocados por ésteres de cadeia curta, comparativamente a ésteres de cadeia mais longa. Um outro estudo, realizado por Guichard *et al.* (2017), observou a relação entre a saliva e a percepção de aroma. Neste trabalho, os investigadores identificaram a atividade lipolítica e o conteúdo de sódio da saliva, como os parâmetros que apresentam mais impacto na percepção do aroma de vários queijos. Estes demonstraram que indivíduos com baixo teor em sódio salivar perceberam aromas salgados como mais intensos, enquanto que, indivíduos com alta atividade lipolítica detetaram o aroma de gorduras como mais intenso, resultados estes, que podem indicar que a sensibilidade, tanto ao sal, como à gordura, pode estar relacionada com a composição salivar, à semelhança do que já havia sido proposto noutros estudos (Mosca & Chen, 2017).

São várias as proteínas que têm sido associadas à forma com que percebemos os alimentos. Como já foi referido, a composição salivar é muito individualizada, ou seja, cada indivíduo possui diferentes quantidades de determinada proteína, o que vai resultar numa percepção, do mesmo alimento, diferente para cada indivíduo. Por exemplo, se

não possuímos todos a mesma quantidade de proteínas envolvidas no desenvolvimento da sensação de adstringência, é espectável que, para um determinado produto, não percebamos todos a adstringência com a mesma intensidade (Lamy, 2022). No entanto, importa realçar que não é só a composição salivar que pode afetar a forma como as características sensoriais dos alimentos são percebidas. Vários estudos demonstram que também as nossas escolhas / hábitos alimentares e a nossa dieta podem ter impacto na composição proteica da saliva (ex. Louro *et al.*, 2021; Morzel *et al.*, 2017).

2.4.1. Alterações induzidas por estímulos pré-ingestivos

Como já foi abordado, os estímulos pré-ingestivos, que levam às respostas de fase cefálica, tais como as propriedades sensoriais dos alimentos, podem induzir alterações fisiológicas que preparam o nosso organismo para o consumo dos mesmos. Vários estudos têm vindo a ser realizados no sentido de melhor compreender e caracterizar estas alterações.

Por exemplo, Keesman *et al.* (2016), estudaram o efeito de três estímulos alimentares (um alimento atraente, neutro e azedo) e um não alimentar na salivação. Neste estudo, metade dos participantes foram instruídos a simplesmente observar os alimentos, e a restante metade, a simular a sua ingestão através do manuseamento dos alimentos, mas sem os colocarem realmente na boca. Os resultados demonstraram que os estímulos alimentares geraram respostas salivares mais fortes, especialmente o alimento atraente e o azedo, comparativamente ao estímulo não alimentar. Também foi notório que das duas condições experimentais, foi a simulação da ingestão dos alimentos a que resultou numa maior salivação. Uma limitação apontada pelos investigadores, foi o facto de não terem conseguido separar as fontes visuais e olfativas que contribuiriam para a diferença da salivação entre cada um dos alimentos. Num outro estudo, também van der Waal *et al.* (2021) estudaram os estímulos pré-ingestivos. Estes demonstraram que a exposição às propriedades sensoriais do chocolate, nomeadamente visão e odor, resultaram num aumento da salivação e os participantes relataram sentir mais desejo após a exposição ao alimento, num estado de fome, do que num estado saciado. O mesmo efeito, do nível de saciedade, não se verificou para a salivação.

Apesar da observação do aumento da resposta salivar, induzida por estímulos pré-ingestivos, a informação acerca das alterações que os mesmos induzem na composição proteica da saliva é escassa, ou mesmo praticamente inexistente. Ainda assim, existem

alguns trabalhos em que as alterações provocadas pelo odor dos alimentos, a nível da composição salivar, foram estudadas. Morquecho-Campos *et al.* (2019) realizaram dois estudos, nos quais estudaram as alterações induzidas pelo odor de alimentos que variavam entre eles na qualidade gustativa (doce, salgado e azedo) e nos macronutrientes (alimentos ricos em proteínas, hidratos de carbono, gordura e com baixo teor calórico). A taxa de secreção salivar aumentou significativamente pela exposição ao odor dos alimentos, comparativamente a condições sem odor e a odores não alimentares. No entanto, para os parâmetros salivares analisados (amílase, lípase e mucina 5B) não se observaram alterações na composição salivar. Por outro lado, Carreira *et al.* (2020), também estudaram as alterações induzidas pelo odor de um alimento, neste caso, o pão. Para além dos autores demonstrarem que este estímulo provocava aumentos na taxa de secreção salivar, foram também observadas alterações no proteoma salivar. Por exemplo, o odor do pão provocou um aumento significativo a nível das cistatinas S, das imunoglobulinas e de duas formas de amílase. Adicionalmente, um trabalho recente do Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada – MED, UEvora (*não publicado*), vem reforçar o efeito que cheirar alimentos tem no proteoma salivar. Neste caso, os participantes cheiraram limão e baunilha. Foram observadas alterações mais marcadas, no proteoma salivar, no caso do cheiro do limão, apesar de também se observarem algumas alterações com o cheiro de baunilha. As alterações não foram nas mesmas proteínas para ambos os estímulos: bandas proteicas contendo amílase e proteína induzida por prolactina (PIP) só sofreram alterações significativas, nas suas concentrações relativas, após estimulação com cheiro de limão.

Ainda que a visão seja um estímulo sensorial bastante importante para a seleção de alimentos, são poucos os estudos que avaliam os efeitos deste estímulo isolado. Mais recentemente, Lai *et al.* (2021), com recurso a fotografias e vídeos de alimentos, demonstraram que os estímulos visuais provocavam alterações a nível da secreção salivar e do diâmetro da pupila, sendo este último comumente usado como indicador de atenção, stress ou emoção. Assim, apesar de se saber que os estímulos visuais alimentares desencadeiam emoções e alterações a nível fisiológico, incluindo salivação, que seja do nosso conhecimento, ainda não é conhecido o efeito que os mesmos podem ter na composição proteica da saliva.

Capítulo 3 | **Metodología Experimental**

3.1. Ensaio

3.1.1. Participantes

Através de contactos diretos, divulgação nas redes sociais e na Universidade de Évora, foram recrutados um total de 44 participantes saudáveis (N=44; 33 do sexo feminino e 11 do sexo masculino) com idades compreendidas entre os 19 e os 62 anos. Cada voluntário foi instruído a tomar o pequeno-almoço, da forma habitual e, a partir daí, não ingerir nenhum alimento ou bebida, que não água, até 1h30min antes do ensaio. Devido à pandemia de COVID-19 e às regras aplicadas em espaços fechados, os participantes utilizaram sempre máscara, apenas retirando nos momentos de recolha. Antes do início do estudo, todos os participantes leram e assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 1) e a cada indivíduo foi atribuído um código de identificação de seis dígitos. Também foram obtidas informações sobre as preferências alimentares e dados pessoais, através de um questionário que será descrito em detalhe numa secção seguinte.

Os ensaios foram realizados ao longo de duas semanas, durante o período da manhã, em três possíveis horários (9h45, 11h e 12h) no Colégio Luís António Verney e no Pólo da Mitra da Universidade de Évora. No total foram realizadas quinze sessões, cada uma com a duração de aproximadamente 1h e contaram com dois a três indivíduos por sessão. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comité de ética da Universidade de Évora.

3.1.2. Desenho experimental e recolha de saliva

Através de óculos de realidade virtual (RV) (*Oculus Quest*), cada participante foi exposto a quatro estímulos visuais, dos quais três alimentares e um não alimentar (controlo). O material biológico estudado foi saliva mista não estimulada e, para cada estímulo, ocorreram dois momentos de recolha, antes e durante o estímulo visual.

Depois da explicação detalhada do procedimento, realizou-se a primeira recolha de saliva. De seguida, os participantes colocaram os óculos de RV e observaram uma imagem, enquanto realizavam a segunda recolha de saliva. Todas as recolhas tiveram a duração de 4 minutos, assim como a visualização do estímulo. Este procedimento repetiu-se para os quatro estímulos, ocorrendo um intervalo de 5 a 10 minutos entre cada estimulação. Durante este período de intervalo, os participantes preencheram um questionário acerca das sensações / emoções desencadeadas pelo estímulo

visualizado. O desenho experimental encontra-se esquematizado na figura 6. Neste ensaio, os óculos de RV foram usados com o objetivo de potenciar a visão e isolar os outros estímulos e não de criar uma experiência imersiva.

A saliva foi recolhida através de recolha passiva para um tubo de propileno (tubo de *falcon*) previamente identificado. Para as recolhas, foi pedido a cada participante que não estimulasse mecanicamente a produção de saliva e acumulasse toda a saliva produzida na boca, cuspidando para o tubo cada vez que precisasse. Mas que, preferencialmente, cuspisse apenas no fim dos 4 minutos, de modo a padronizar as condições de recolha e a evitar possíveis estimulações. A saliva foi imediatamente passada para gelo onde foi mantida até à chegada ao laboratório. Foi posteriormente armazenada a -20°C até às análises seguintes.

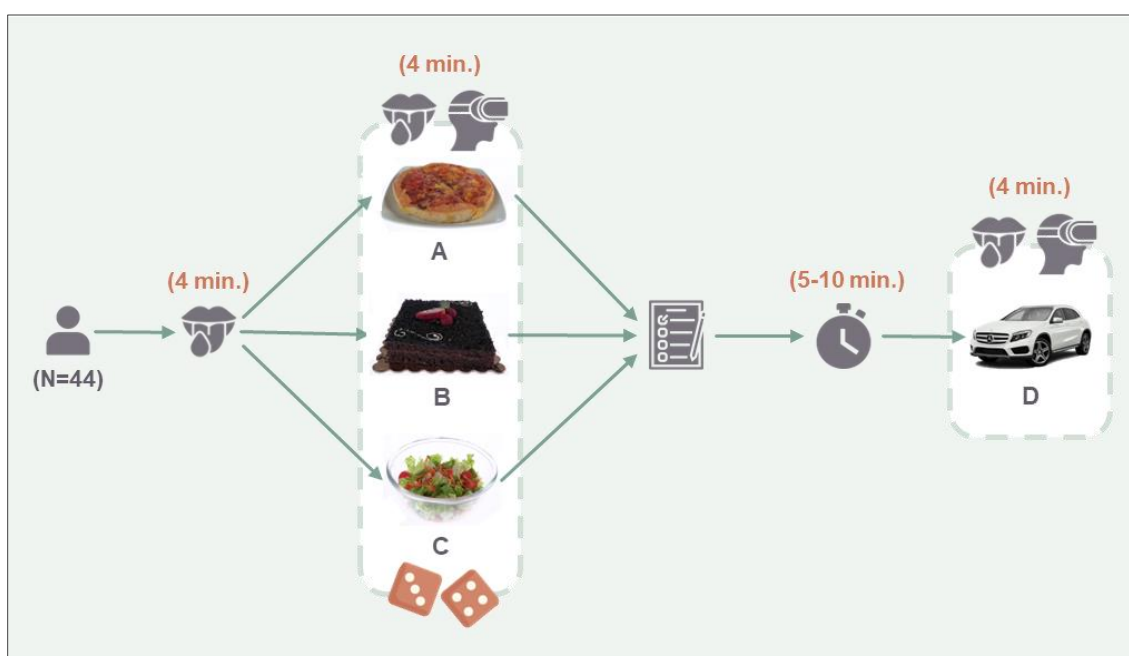


Figura 6: Desenho experimental e estímulos visuais apresentados. Todos os participantes foram expostos aos quatro estímulos. A - alimento palatável salgado tipo *fast-food*; B - alimento palatável doce; C - alimento de baixa palatibilidade (saudável); D – estímulo não alimentar (controlo).

3.1.3. Estímulos visuais

Como já foi referido, foram apresentados três estímulos visuais alimentares e um controlo (Figura 6). Dos estímulos alimentares foi apresentado uma imagem de um alimento palatável salgado tipo *fast-food* (pizza), um alimento palatável doce (bolo de chocolate) e um alimento de baixa palatabilidade (salada). A imagem controlo, não

alimentar, tratou-se de um carro. Os estímulos alimentares foram visualizados primeiramente, por ordem aleatória, enquanto que, o controlo foi sempre o último estímulo visualizado pelos participantes.

As imagens alimentares apresentadas foram baseadas nas imagens existentes na base de imagens *FoodPic* já validadas para a população portuguesa, relativamente ao efeito que produzem (Prada *et al.*, 2017). Uma vez que estas imagens não possuíam a qualidade necessária para serem visualizadas em óculos de RV, foram tiradas novas fotos, o mais próximas possível das imagens testadas no estudo referido. As fotos foram tiradas na Escola de Artes, da Universidade de Évora, por profissionais da área, propositadamente para este estudo.

3.1.4. Questionários

3.1.4.1. Questionário acerca das sensações / emoções desencadeadas pelas imagens

Após a visualização de cada estímulo os participantes preencheram um questionário para avaliar a intensidade com que um conjunto definido de sensações / emoções foi percebido, assim como o nível de apetite / saciedade (Anexo 2). As respostas a este questionário foram dadas para a intensidade percebida numa escala de nove pontos. Foi analisado o nível de apetite para o consumo de uma refeição completa, para o alimento visualizado em particular e a intensidade percebida para oito sensações / emoções diferentes (desejo; água na boca; bem-estar / calma; fascínio / excitação; ansiedade; alegria; repulsa; apatia / indiferença). Devido à natureza das questões, e por se tratar de uma imagem não alimentar, este questionário não foi aplicado à imagem controlo (carro).

3.1.4.2. Questionário de preferências alimentares e dados pessoais

Como já foi referido anteriormente, também foram obtidas informações sobre os hábitos e preferências alimentares de cada participante assim como alguns dados pessoais, tais como idade, género, peso, altura, se era fumador ou se possuía algum tipo de patologia associada a perda de olfato ou paladar (Anexo 3). Através de duas escalas, os participantes descreveram o gosto por vinte alimentos diferentes e a frequência com que os consomem no seu dia-a-dia. As respostas a este questionário

foram dadas para o gosto pelo alimento numa escala de sete pontos e para a frequência com que o consomem numa escala de seis pontos. Este questionário foi respondido ao longo dos vários intervalos que ocorreram entre as visualizações das imagens.

3.2. Tratamento das amostras de saliva

Para remover mucinas e resíduos celulares e / ou alimentares, as amostras de saliva foram descongeladas em gelo, pesadas (Balança analítica VWR), e centrifugadas (Hermle Z323K) a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado, alíquotado e posteriormente armazenado a -80°C até à análise seguinte.

3.3. Taxa de secreção salivar

Para a determinação da taxa de secreção salivar, assumiu-se que a densidade da saliva é 1,0 g/mL. Os tubos que continham saliva foram devidamente pesados e, posteriormente, foi subtraído o peso dos tubos vazios. O valor resultante foi dividido pelo tempo de recolha, ou seja, 4 minutos.

3.4. Análise da composição da saliva

Devido ao elevado número de amostras (8 recolhas por participante), dos 44 indivíduos em estudo, selecionou-se uma sub-amostra de 20 participantes, pertencentes a ambos os sexos, e que avaliaram os parâmetros “desejo” ou “água na boca”, para pelo menos uma das imagens alimentares, com uma pontuação igual ou superior a sete. Fumadores foram evitados.

3.4.1. Quantificação proteica pelo método de Bradford

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. Este método baseia-se na alteração da absorvância, em meio ácido, do corante de ligação azul brilhante *Coomassie* (CBB) G-250 que, quando ligado a proteínas, altera a sua coloração de castanho-avermelhado para azul (Bradford, 1976).

Através de diluições sucessivas, a partir de uma solução mãe de BSA, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, prepararam-se soluções com concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para traçar a curva de calibração. As amostras de saliva foram descongeladas em gelo e diluídas 4x, 8x e 12x com água ultrapura (*Milli Q*), a fim de garantir a sua interpolação na curva de calibração. No caso das amostras, as diluições foram preparadas, diretamente, a partir da amostra original, não tendo sido feitas diluições sucessivas. Pipetaram-se 10 μL de cada solução de BSA e o mesmo volume de cada amostra, em triplicado, para uma microplaca de 96 poços. Usou-se água ultrapura como branco. De seguida, adicionaram-se 200 μL de reagente de Bradford a cada poço, este, que foi previamente preparado [10% (m/v) reagente CBB G-250; 5% etanol 95%; 10% ácido fosfórico 85%] e armazenado a 4°C entre utilizações. Incubou-se a placa à temperatura ambiente, durante 1 a 2 minutos e realizaram-se as leituras de absorvância a 600 nm, num leitor de microplacas (Glomax, Promega).

Após as leituras, foram calculadas médias e respetivos desvios-padrão dos valores de absorvância obtidos. Com os valores médios das absorvâncias de cada padrão de BSA em função da quantidade de proteína, traçou-se uma reta de calibração para cada placa (Figura 7). Usando a equação da reta, e tendo em conta os fatores de diluições aplicados, calculou-se a concentração de proteína total das amostras.

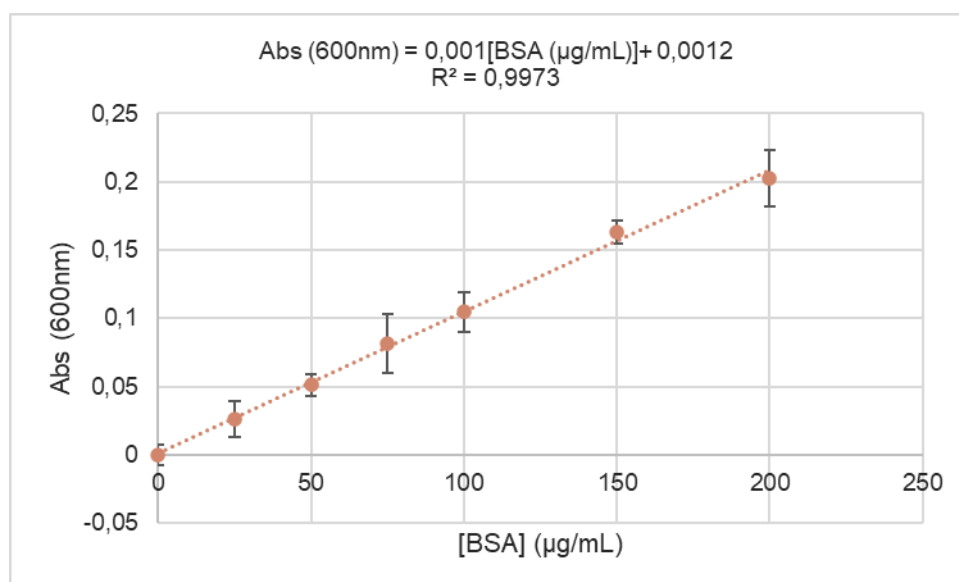


Figura 7: Exemplo de uma curva padrão de BSA usada para a determinação da concentração de proteína total das amostras.

3.4.2. Análise do proteoma salivar

3.4.2.1. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Esta técnica analítica, originalmente descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), separa as proteínas de acordo com as suas massas moleculares e pode ser dividida em 4 etapas: preparação dos géis, preparação das amostras, separação eletroforética e, por fim, a coloração dos géis.

Começou-se por preparar uma solução de persulfato de amónio (APS) 10% (*m/v*). De seguida montou-se o sistema de eletroforese, colocaram-se os vidros de 1 mm previamente limpos e secos e preparou-se o gel de resolução [5 mL de Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8; 200 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS), 8 mL de acrilamida/bis – acrilamida 30% (*m/v*); 6,8 mL de água destilada; 150 µL de APS 10%, e 10 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED)]. O APS e o TEMED foram os últimos adicionados, uma vez que são agentes polimerizadores. De seguida, pipetou-se a solução para os vidros e acrescentou-se uma camada de água destilada para impedir o contacto entre a solução do gel com o ar, uma vez que a acrilamida polimeriza na ausência de oxigénio. Uma vez polimerizado, preparou-se o gel de concentração [2 mL de Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8; 80 µL de SDS; 4,86 mL de água destilada; 1,06 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30%; 4,8 µL de APS e 8,8 µL de TEMED]. À semelhança do ocorrido na preparação do gel anterior, os agentes polimerizadores foram os últimos adicionados. Por inversão do sistema de encaixe, retirou-se a camada de água destilada que tinha sido colocada em cima do gel de resolução e pipetou-se a solução do gel de concentração até ao topo do vidro. Colocaram-se os pentes e deixou-se polimerizar.

Para cada amostra de saliva, um volume correspondente a 7 µg de concentração de proteína total foi misturado com solução tampão [0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (*v/v*), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol; 0,002% (*m/v*) azul de bromofenol]. Tendo em conta que o tampão se encontrava 6x concentrado, o volume de tampão utilizado correspondeu a 1/5 do volume da amostra. As amostras em que não foi possível obter uma quantidade de proteína total de 7 µg num volume final inferior a 30 µL, que corresponde ao volume máximo que leva cada poço, foram previamente liofilizadas (liofilizador *Freeze Dryer Modulyo*). Este procedimento foi adotado por se ter observado, num estudo prévio (não publicado) que a liofilização não afeta o perfil proteico eletroforético, neste tipo de amostras. Depois da mistura entre as amostras e o tampão

de amostra, foi feito um aquecimento a 98°C, num banho seco durante 5 minutos. Após o tempo de aquecimento, as amostras foram passadas imediatamente para gelo.

Depois da preparação das amostras, montou-se o sistema para a corrida de eletroforese. Retiraram-se os géis dos suportes e os respetivos pentes. Colocaram-se os géis no sistema com os elétrodos e colocou-se o sistema na tina. Deitou-se tampão de corrida [0,0025 M Tris; 0,0192 M glicina; 0,1% (*m/v*) SDS], previamente preparado, no reservatório criado com a junção dos géis (câmara interna), para garantir que não ocorriam fugas e, posteriormente, deitou-se na restante tina (câmara externa). Aplicou-se um marcador de massas moleculares (*Millipore MPSTD4*) num dos poços, e nos restantes, as amostras. De seguida, colocou-se a tampa, ligou-se à fonte de alimentação e iniciou-se a corrida a uma voltagem constante de 150 V até a frente de corrida atingir o final do gel.

Após a corrida, colocaram-se os géis em solução de fixação (40% metanol, 10% ácido acético) em agitação durante 1 hora. Descartou-se a solução e adicionou-se solução corante [1% CBB R-250, 50% metanol, 10% ácido acético] durante uma 1 hora em agitação. Por fim, descorou-se os géis em diferentes mudas de solução descorante (10% ácido acético). Uma vez que descorados, os géis foram passados para água destilada e digitalizados com recurso ao scanner *ImageScanner III (Epson)*, usando o *software Labscan (GE Healthcare)*.

A análise dos géis SDS-PAGE foi realizada com recurso ao *software ImageLab (BioRAD)*. As *lanes* e as bandas proteicas foram detetadas automaticamente, havendo edição manual sempre que se justificava, devido a alguma falha do método automático. Após a deteção das bandas, as mesmas foram automaticamente convertidas em volume relativo (% volume relativo ao volume total de cada *lane*). Estes valores foram posteriormente usados para análise estatística.

3.4.2.2. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Tendo em conta as quantidades limitantes de amostra, juntamente com as limitações da técnica, em termos de análise de um grande número de imagens, foram constituídos *pools* para separação das proteínas por eletroforese bidimensional. Os *pools* foram constituídos por 5 indivíduos, cada, de modo a que para cada condição experimental existissem 3 *pools* diferentes (de modo a constituírem replicas biológicas que permitissem análise estatística). Mais uma vez, dada a exigência da técnica (em termos de análise), a comparação foi feita apenas considerando um tipo de imagem de

alimento (bolo de chocolate), dividindo em indivíduos para quem o bolo de chocolate teve o efeito de aumentar a salivação (e a percepção de “desejo” e “água na boca”), indivíduos para quem o bolo de chocolate não teve esse efeito, e considerando a imagem controlo (carro). De modo sumário constituíram-se amostras combinadas (*pools*) de 5 indivíduos, cada para: bolo de chocolate com aumento de salivação (3 *pools* antes e 3 *pools* durante), bolo de chocolate sem aumento de salivação (3 *pools* antes e 3 *pools* durante) e carro (3 *pools* antes e 3 *pools* durante). Cada amostra *pool* foi testado em duplicado, de modo a constituir replicas técnicas.

Cada *pool* foi preparado de modo a conter a mesma quantidade de proteína de cada uma das amostras individuais que o constituíram.

A focagem isoeétrica, que constitui a primeira dimensão da eletroforese bidimensional, foi feita em tiras de gel de gradiente comerciais (IPG *strips* 3-10NL, GE *Healthcare*). Para a focagem isoeétrica, em cada tira foi aplicado um total de 125 μg de proteína total. Dada a quantidade de volume de saliva necessária ser demasiado elevada, os *pools* foram liofilizados. Uma vez que liofilizadas, suspenderam-se as amostras em solução de reidratação [7 M ureia; 2 M tioureia; 4% (*m/v*) Chaps; 2% (*v/v*) IPG *buffer* (3-10NL); 40 mM Ditiotreitól (DTT)] num volume de 125 μL .

Incubou-se à temperatura ambiente por 1 hora. De seguida, centrifugou-se a uma velocidade de 10000 *rpm*, durante 10 minutos à temperatura ambiente (*Eppendorf centrifuge* 5424), para precipitar algumas partículas que pudessem ter ficado em suspensão. Aplicou-se o sobrenadante de cada *pool* nas ranhuras do suporte para tiras, do sistema *Multiphor II* (GE *healthcare*). Colocaram-se as tiras em contacto com a amostra, e ficaram em reidratação passiva durante a noite, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral (*Dry strip cover fluid*, GE *healthcare*).

Após a reidratação, as tiras foram colocadas no sistema *Multiphor II*, para focagem isoeétrica das proteínas (primeira dimensão). A focagem ocorreu a uma temperatura de 12°C de acordo com o programa: passo 1 – subida para 100V (0:01h), passo 2 - 300V (1:00h), passo 3 – subida para 3500V (4:00h), passo 4 – 3500V (3:30h). Depois, as tiras foram colocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca e foram armazenadas a -20°C até à realização da segunda dimensão.

Para a segunda dimensão (separação por massas moleculares) foi feita a preparação dos géis SDS-PAGE da forma já descrita anteriormente. Posteriormente, descongelou-se uma alíquota de solução de equilíbrio [6 M ureia, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% (*v/v*) glicerol, 2% (*m/v*) SDS e 0,002% (*m/v*) de azul de bromofenol] e de seguida realizaram-se dois passos de equilíbrio: redução com DTT e alquilação com

iodoacetamida. Para o primeiro passo, adicionou-se uma solução de 1% (*m/v*) DTT à solução de equilíbrio descongelada anteriormente e adicionou-se 5 mL desta solução a cada tira. Deixou-se em agitação durante 15 minutos à temperatura ambiente e descartou-se a solução. Para o segundo passo, o processo foi semelhante. Adicionou-se à solução de equilíbrio uma solução de 2,5% (*m/v*) iodoacetamida, e adicionou-se 5 mL desta solução a cada tira. De seguida, colocou-se novamente em agitação durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Lavaram-se as tiras com tampão de corrida (com a mesma composição já descrita na secção referente à separação proteica por SDS-PAGE). Colocaram-se as tiras no topo do gel de resolução e adicionou-se, em cima da tira, uma solução de 0,5% (*m/v*) de agarose de modo a fixá-la. Por fim, realizou-se a corrida eletroforética nas condições já descritas anteriormente.

Também à semelhança do que foi realizado no SDS-PAGE, os géis foram posteriormente colocados em solução de fixação em agitação durante cerca de 1 hora. De seguida, descartou-se a solução e foram corados durante 1h e descorados em várias mudas de solução descorante. Todas as soluções referidas possuem a mesma composição das usadas no SDS-PAGE e, que por sua vez, já foram descritas anteriormente. Por fim os géis foram passados para água destilada e digitalizados através do scanner ImageScanner III (*Epson*) e do *software* Labscan (*GE Healthcare*), também já referidos anteriormente.

A análise aos perfis bidimensionais foi realizada com recurso ao *software* SameSpots (*totalab*). Após indicação da área da imagem a considerar e seleção automática do gel de referência, cada gel foi alinhada com este, primeiro de forma manual, tendo este alinhamento manual servido de base para o alinhamento automático. A deteção de *spots*, em função dos géis alinhados foi corrigida, editando apenas aqueles em que a marcação estivesse errada. A análise estatística foi feita diretamente no *software*.

3.5. Análise estatística

Os diferentes parâmetros foram testados relativamente à existência de distribuição normal (Shapiro-Wilk).

De modo a avaliar a existência de diferenças nas reações desencadeadas pelas diferentes imagens de alimentos, foi realizada uma análise de variância simples (*one-*

way ANOVA). Neste caso, apenas a exposição às imagens de pizza, bolo de chocolate e salada foram testados, uma vez que, para a exposição à imagem do carro não foram medidos os níveis de cada uma das variáveis de sensações / emoções. Este teste foi realizado, numa primeira fase, sem considerar um possível efeito de outras variáveis.

De modo a poder considerar as preferências gustativas, para cada paladar (doce, amargo, ácido e salgado), as pontuações dadas aos diferentes alimentos representativos desse paladar foram somadas. Esse somatório permitiu obter as variáveis: “preferência por doce”, “preferência por amargo”, “preferência por ácido” e “preferência por salgado”. Posteriormente, e de modo a encontrar “novas variáveis” capazes de representar o tipo de preferência gustativa, foi feita uma análise de componentes principais (PCA), onde as variáveis incluídas foram cada uma das quatro descritas anteriormente. Usou-se a rotação Varimax, e a adequação foi avaliada através do teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e a esfericidade pelo teste de Bartlett.

Tendo em conta a percentagem de explicação da variância pelas componentes obtidas, a componente 2, “preferência por palatável” foi usada como covariável e testada através de uma análise de covariância (ANCOVA), onde as três imagens alimentares foram novamente comparadas para as sensações / emoções desencadeadas.

Para a avaliação do efeito de cada uma das imagens nos diferentes parâmetros salivares, foi usado um teste GLM (*General Linear Model*), em que o fator 1, período, apresentou 2 níveis (antes e durante). Como variável *between-subjects* usou-se o tipo de imagem. O modelo comparou período, tipo de imagem e a interação entre período e tipo de imagem. Uma vez que este modelo permite avaliar a existência de interação entre período e tipo de alimento (ou seja, permite avaliar se as alterações entre antes e durante são diferentes para diferentes tipos de alimentos), mas não permite fazer a comparação entre pares (ou seja, não permite ver as diferenças entre antes e durante para cada tipo de imagem, em separado), foi ainda usado o teste T, para amostras emparelhadas, de modo a comparar os parâmetros salivares antes e durante a visualização das imagens, considerando cada uma delas em separado.

Tendo em conta que o “desejo de ingerir” é uma variável que pode ter influência no efeito que cada imagem tem, na salivação, o modelo GLM descrito anteriormente foi repetido, mas desta vez considerando o “desejo de ingerir” como covariável.

Finalmente, e de modo a avaliar a existência de relação entre as variações nos parâmetros salivares e as sensações / emoções desencadeadas, foi usado o teste de correlação de Pearson, tendo as variáveis emocionais e as variáveis salivares testadas de forma univariada. No que diz respeito às variáveis salivares e tendo em conta que se

pretendeu relacionar “variação” nos parâmetros com as sensações desencadeadas pelas imagens, considerou-se, a diferença entre o valor do parâmetro na saliva recolhida durante a visualização e o valor do parâmetro na saliva recolhida antes da visualização (Δ). Para além da análise univariada, usou-se ainda a PCA, para as variáveis emoções, de modo a reduzir as mesmas a novas variáveis (componentes) com significado representativo das reações desencadeadas pelas imagens. Tal como na situação descrita anteriormente, também aqui foi usada uma rotação Varimax e a adequação foi avaliada através do teste de KMO e a esfericidade pelo teste de Bartlett. Foram extraídas as componentes “emoções positivas” e “emoções negativas” que foram posteriormente correlacionadas, através do teste de correlação de Pearson, com os parâmetros salivares (variações calculadas como descrito anteriormente).

Como já foi referido anteriormente, para a análise estatística dos perfis bidimensionais, utilizou-se o *software SameSpots* (totallab). Os *spots* obtidos para cada *pool* foram comparados. Consideraram-se três situações: situação controlo (durante a visualização de imagem não alimentar - carro, durante a visualização de alimento palatável – bolo. No caso do bolo foram consideradas as situações em que a imagem teve efeito em termos de desejo/salivação e a situação em que a imagem não teve efeito em termos de desejo / salivação. As comparações foram realizadas através de ANOVA.

Com exceção dos *spots* proteicos, resultantes da análise por 2-DE, a análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS (IBM, versão 25). Foi considerado um intervalo de confiança de 95%, sendo por isso valores de P inferiores a 0,05 indicativos de um resultado estatisticamente significativo.

Capítulo 4 | **Resultados**

4.1. Efeito da visualização das diferentes imagens na percepção de sensações / emoções

As diferentes imagens de alimentos (pizza, bolo de chocolate e salada) produziram algumas diferenças em termos de sensações / emoções, percebidos pelos participantes (N=44). No caso do apetite específico para o alimento visualizado, apenas se observou uma tendência, enquanto que para o desejo de ingerir, sensação de água na boca e excitação, a pizza diferiu significativamente da salada, sendo a imagem de pizza aquela que desencadeou maiores níveis percebidos destas sensações. Já no que diz respeito às sensações de bem-estar, felicidade, repulsa e indiferença, não se observaram diferenças entre as imagens de alimentos (Tabela 2 e Figura 8).

Relativamente à sensação de ansiedade, também foi a imagem de salada aquela que levou a menores percepções desta sensação, mas neste caso só diferiu significativamente do bolo, ao contrário das sensações de apetite específico, desejo ou água na boca, referidas anteriormente, onde as diferenças estatisticamente significativas foram entre a salada e a pizza (Tabela 2 e Figura 8).

Tabela 2: Sensações (média \pm desvio padrão) desencadeadas pela visualização das diferentes imagens de alimentos.

Sensação / emoção	Imagem alimentar			P
	Pizza	Bolo	Salada	
Apetite específico para o alimento visualizado	6,20 \pm 2,21	5,66 \pm 2,22	5,07 \pm 2,21	0,054
Desejo de ingerir	6,11 \pm 2,16 ^a	5,70 \pm 2,10 ^{a,b}	4,58 \pm 2,27 ^b	0,004*
Água na boca	6,00 \pm 2,07 ^a	5,64 \pm 2,13 ^{a,b}	4,23 \pm 2,37 ^b	0,001*
Bem-estar	4,89 \pm 2,12	4,84 \pm 2,05	5,19 \pm 2,23	0,716
Excitação	4,27 \pm 2,47 ^a	4,18 \pm 2,15 ^{a,b}	3,07 \pm 2,10 ^b	0,024*
Ansiedade	2,18 \pm 1,82 ^{a,b}	2,34 \pm 2,19 ^a	1,37 \pm 0,87 ^b	0,020*
Felicidade	4,93 \pm 2,31	4,86 \pm 1,97	3,93 \pm 2,35	0,067
Repulsa	1,11 \pm 0,62	1,16 \pm 0,81	1,05 \pm 0,31	0,692
Indiferença	2,27 \pm 1,99	2,32 \pm 1,88	2,84 \pm 2,21	0,358

Nota: Letras diferentes significam diferenças, nos níveis das sensações, entre as diferentes imagens; * significativo para um valor de $P < 0,05$.

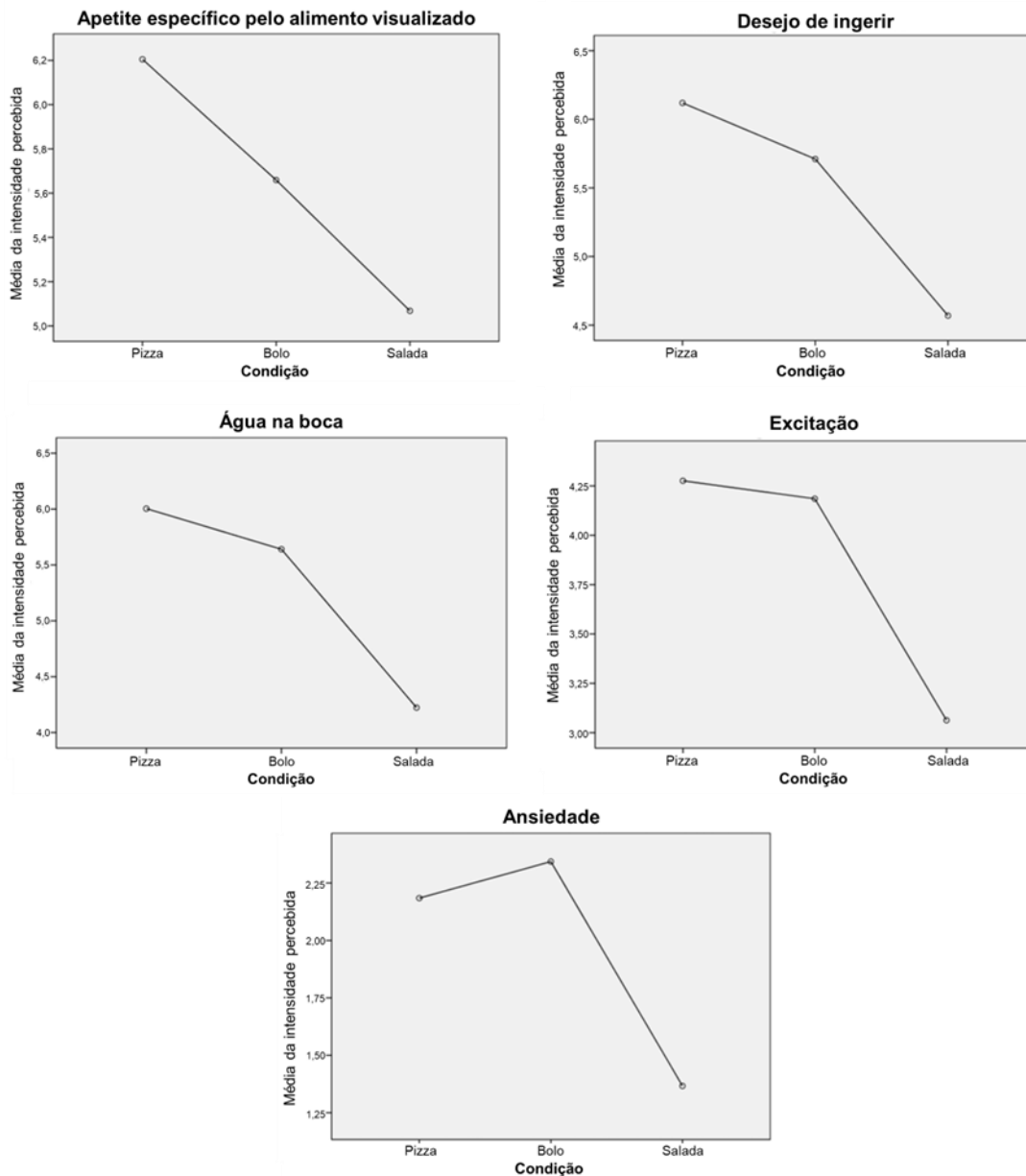


Figura 8: Representação gráfica das intensidades percebidas das sensações para as quais se observaram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.

Tendo em conta que as preferências de cada indivíduo, por diferentes alimentos, podem afetar a forma como as imagens são percebidas por cada um deles, estas foram usadas como covariáveis. Assim, foram considerados os dados das preferências por doce, ácido, salgado e amargo neste modelo. O objetivo é usar esta informação como covariável, ou seja, comparar o efeito da observação das diferentes imagens ajustando para as diferentes preferências individuais.

Tendo em consideração que o questionário de preferência agrupa os alimentos nas quatro qualidades gustativas (conforme anteriormente referido na secção de materiais e métodos), foi necessário criar uma “nova variável” de preferência. Para isso foi feita uma PCA, conforme descrito na secção de materiais e métodos. Desta análise foi possível extrair dois componentes, capazes de explicarem 68% do total de variância. Os dados referentes à adequação do modelo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Dados de adequação do modelo de análise de componentes principais.

Teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e teste de Bartlett		
KMO		,489
Teste de Esfericidade de Bartlett	Qui-quadrado aprox.	59,243
	Graus de liberdade	6
	P	,000

As duas componentes extraídas, foram consideradas como 2 “novas variáveis”, sendo a componente 1 associada a “preferências saudáveis”, por representar menor preferência por doce, moderada preferência por salgado e elevada preferência por ácido e amargo. A componente 2 foi considerada como a nova variável “preferência por palatável” por estar associada a níveis mais elevados de preferência por doce e salgado (Tabela 4).

Tabela 4: Peso das diferentes variáveis para cada uma das componentes (rotação varimax).

Rotação varimax		
Preferência	Componente	
	1	2
Doce	-,392	,745
Ácido	,745	
Salgado	,366	,783
Amargo	,845	

O efeito que os alimentos tiveram na percepção das diferentes sensações / emoções foi testado considerando a “preferência por palatável” como covariável. Observou-se um efeito significativo da covariável nos seguintes parâmetros: apetite específico para o

alimento visualizado, desejo de ingerir, água na boca, bem-estar, excitação, felicidade e indiferença (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre as sensações (média \pm desvio padrão) desencadeadas pela visualização das diferentes imagens de alimentos, considerando a preferência por palatável como covariável.

Sensação / emoção	Imagem alimentar			P (ANOVA)	P (preferência por palatável)
	Pizza	Bolo	Salada		
Apetite específico para o alimento visualizado	6,20 \pm 2,21 ^a	5,66 \pm 2,22 ^{a,b}	5,07 \pm 2,21 ^b	0,038*	0,0005*
Desejo de ingerir	6,11 \pm 2,16 ^a	5,70 \pm 2,10 ^{a,b}	4,58 \pm 2,27 ^a	0,002*	0,0005*
Água na boca	6,00 \pm 2,07 ^a	5,64 \pm 2,13 ^{a,b}	4,23 \pm 2,37 ^b	0,0005*	0,001*
Bem-estar	4,89 \pm 2,12	4,84 \pm 2,05	5,19 \pm 2,23	0,652	0,029*
Excitação	4,27 \pm 2,47 ^a	4,18 \pm 2,15 ^{a,b}	3,07 \pm 2,10 ^b	0,024*	0,017*
Ansiedade	2,18 \pm 1,82 ^{a,b}	2,34 \pm 2,19 ^a	1,37 \pm 0,87 ^b	0,020*	0,074
Felicidade	4,93 \pm 2,31	4,86 \pm 1,97	3,93 \pm 2,35	0,063	0,029*
Repulsa	1,11 \pm 0,62	1,16 \pm 0,81	1,05 \pm 0,31	0,699	0,133
Indiferença	2,27 \pm 1,99	2,32 \pm 1,88	2,84 \pm 2,21	0,417	0,040*

Nota: Letras diferentes significam diferenças, nos níveis das sensações, entre as diferentes imagens; * significativo para um valor de $P < 0,05$.

4.2. Efeito da visualização das diferentes imagens na salivação

4.2.1. Perfil proteico salivar obtido

Tendo em conta o elevado número de participantes avaliados (N=44) e o número de amostras por participante (8 recolhas), para a análise do perfil proteico, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), selecionou-se uma sub-amostra de 20 participantes. Após análise de géis SDS-PAGE foi possível incluir na análise 18 indivíduos. Para os restantes 2 não se conseguiu obter perfis em condições de análise para, pelo menos, uma das recolhas dos indivíduos. O volume existente não permitiu repetir a análise. Os perfis proteicos consistiram em vinte e três bandas proteicas, com massas moleculares compreendidas entre os 14kDa e os 200kDa, consistentemente presentes nos perfis proteicos (Figura 9).

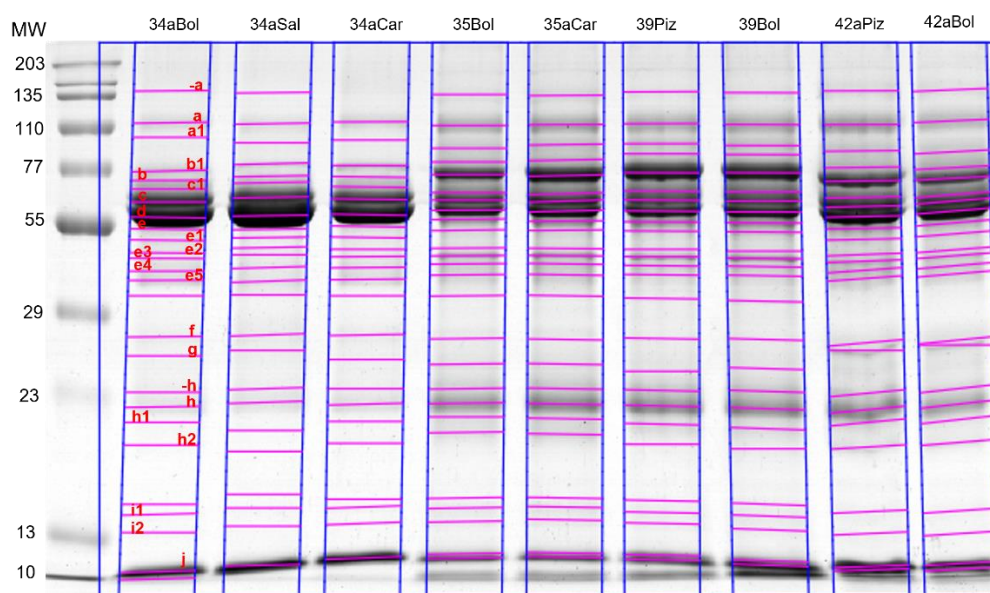


Figura 9: Imagem representativa de um gel SDS-PAGE com as bandas consideradas para análise. MW- Massas moleculares (kDa).

Com base em trabalhos realizados anteriormente (ex. Carreira *et al.*, 2020), onde foi realizada a identificação de bandas proteicas por espectrometria de massa, foi possível realizar uma correspondência e identificar sete das vinte três bandas proteicas consideradas (Tabela 6).

Tabela 6: Identificação das bandas proteicas de acordo com resultados obtidos em estudos realizados previamente para a saliva humana Carreira *et al.*, 2020).

Bandas proteicas	Identificação
-a	n.i.
a	Recetor polimérico de imunoglobulinas (Ig)
a1	n.i.
b1	n.i.
b	Albumina
c1	n.i.
c	Amílase (forma glicosilada)
d	Amílase (forma nativa)
e	n.i.
e1	n.i.

e2	n.i.
e3	Anidrase carbónica (CA VI)
e4	n.i.
e5	n.i.
f	n.i.
g	n.i.
-h	n.i.
h	Cadeia de imunoglobulinas (Ig)
h1	n.i.
h2	n.i.
i1	Proteóformas de proteína induzida por prolactina (PIP)
i2	Proteóformas de proteína induzida por prolactina (PIP)
j	Cistatinas

Nota: n.i. – não identificado.

4.2.2. Variação na salivação e perfil proteico induzido pela visualização das diferentes imagens

Ao usar o modelo GLM medidas repetidas, descrito na secção de materiais e métodos, observaram-se variações na taxa de secreção, estando a mesma significativamente diminuída durante a visualização das imagens, comparativamente ao período anterior ($1,159 \pm 0,098$ mL/min vs. $1,033 \pm 0,080$ mL/min), antes e durante, respetivamente ($P=0,031$). Neste caso não se observou interação significativa entre período e tipo de imagem ($P=0,288$). No entanto, olhando para o gráfico presente na figura 10, é possível notar que a imagem controlo parece estar a ter um grande contributo para esta variação.

Variação da taxa de secreção nas diferentes condições

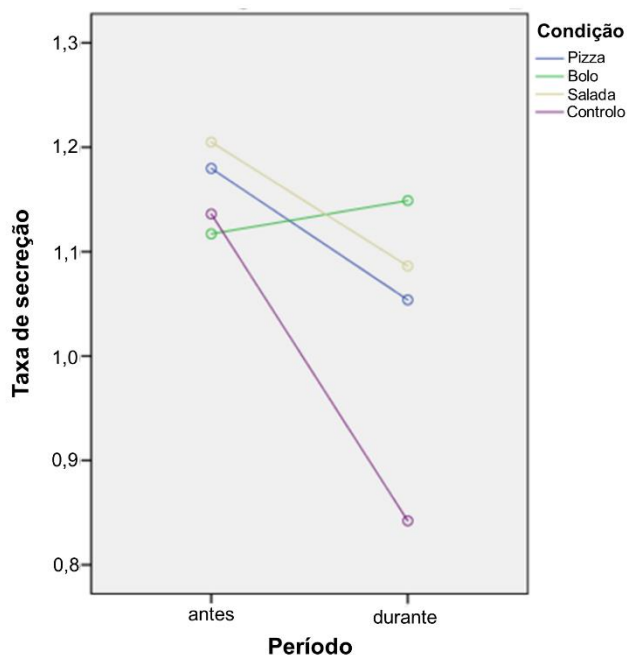


Figura 10: Representação gráfica das taxas de secreção, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controlo).

Assim, as taxas de secreção foram comparadas entre o período antes e durante, para cada um dos alimentos em separado. Pode-se observar que a visualização dos alimentos não provoca alterações significativas, mas a visualização da imagem controlo leva a uma diminuição da taxa de secreção (Tabela 7).

No que diz respeito à concentração, não há interação entre período e tipo de imagem ($P > 0,05$). Quando olhamos para as alterações entre o antes e o durante a visualização, tendo em conta cada imagem em separado, não se observam diferenças quando é a imagem controlo a ser visualizada, mas ocorrem diminuições significativas quer com a visualização da pizza, quer com a visualização da salada (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação das taxas de secreção e concentração em proteína total (média \pm desvio padrão), entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controlo).

Imagem alimentar	Taxa de secreção (mL/min)			Concentração (ug/mL)		
	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P
Pizza	1,18 \pm 1,13	1,05 \pm 0,87	0,347	620,33 \pm 249,43	503,46 \pm 147,05	0,016*
Bolo	1,12 \pm 1,10	1,15 \pm 1,11	0,745	698,11 \pm 273,45	729,40 \pm 256,86	0,644
Salada	1,20 \pm 1,34	1,09 \pm 1,05	0,289	716,48 \pm 296,70	596,70 \pm 242,28	0,044*
Controlo	1,14 \pm 1,08	0,84 \pm 0,77	0,024*	692,72 \pm 388,73	600,77 \pm 269,23	0,201

Nota: * significativo para um valor de $P < 0,05$.

Também para algumas bandas proteicas, foi observada alteração induzida pela visualização das imagens, sendo as alterações em algumas bandas dependentes do tipo de imagem.

Das vinte e três bandas proteicas analisadas, foi a nível da banda b1 (não identificado (n.i.)) que se observou uma interação significativa entre o período de recolha (antes e durante) e o tipo de imagem (Tabela 8), o que mostra que as alterações nos níveis desta banda não são as mesmas para todas as imagens. No caso das bandas c (amílase – forma glicosilada), d (amílase – forma nativa), e3 (CA VI) e j (cistatinas) ocorreu alteração pela visualização das imagens, não havendo interação entre período de recolha e tipo de imagem.

Tabela 8: Alterações no perfil proteico induzidas pelas diferentes imagens (alimentares + controlo) e potencial efeito do tipo de imagem nessas alterações.

Bandas proteicas	P	
	Período	Interação período * imagem
-a	0,371	0,238
a	0,672	0,739
a1	0,353	0,211
b1	0,145	0,042*
b	0,099	0,092
c1	0,363	0,640
c	0,012*	0,977
d	0,0005*	0,319
e	0,894	0,256
e1	0,580	0,174

e2	0,604	0,499
e3	0,026*	0,393
e4	0,182	0,518
e5	0,207	0,917
f	0,637	0,459
g	0,906	0,213
-h	0,496	0,566
h	0,995	0,687
h1	0,170	0,240
h2	0,482	0,058
i1	0,108	0,079
i2	0,053	0,468
j	0,039*	0,110

Nota: * significativo para um valor de $P < 0,05$.

Assim, e de modo a conhecer os efeitos de cada imagem em separado, os valores de % volume das bandas foram comparados entre o período antes e o período durante a visualização, através de um teste T (para amostras emparelhadas) (Tabela 9). Neste caso, apenas a imagem da pizza levou a um aumento significativo das bandas proteicas b1 (n.i.) e b (albumina). Já a banda d (amílase – forma nativa) sofreu diminuição na % volume, quer por efeito da visualização da pizza, quer por efeito da visualização da imagem controlo. Por sua vez, a banda e3 (CA VI) só sofreu aumentos significativos com a visualização da imagem do bolo e a banda j (cistatinas) pela visualização da imagem da salada.

Tabela 9: Comparação dos níveis (% Volume) (média ± desvio padrão) das bandas proteicas, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens (alimentares + controle).

Bandas	Pizza			Bolo			Salada			Controle (Carro)		
	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P
b1	0,84 ± 0,73	1,25 ± 1,07	0,026*	1,26 ± 0,81	0,81 ± 0,83	0,058	1,37 ± 1,95	0,81 ± 0,96	0,164	0,93 ± 1,02	0,77 ± 0,70	0,501
b	9,05 ± 3,85	10,54 ± 4,42	0,007*	10,32 ± 4,21	10,40 ± 4,04	0,878	8,65 ± 3,91	8,34 ± 3,24	0,560	8,84 ± 4,11	9,31 ± 3,42	0,378
c	12,04 ± 3,29	11,25 ± 2,52	0,09	12,15 ± 3,02	11,66 ± 2,87	0,349	12,28 ± 2,97	11,67 ± 2,81	0,267	11,35 ± 3,00	10,63 ± 2,48	0,196
d	14,66 ± 5,31	12,97 ± 5,75	0,005*	14,29 ± 6,38	13,66 ± 5,58	0,379	15,63 ± 8,47	13,25 ± 6,27	0,100	15,56 ± 7,93	12,56 ± 5,15	0,012*
e3	1,35 ± 0,55	1,45 ± 0,58	0,454	1,30 ± 0,48	1,65 ± 0,73	0,025*	1,62 ± 0,62	1,27 ± 0,47	0,546	1,29 ± 0,46	1,34 ± 0,51	0,520
h2	2,19 ± 1,29	1,99 ± 1,02	0,418	1,93 ± 0,93	1,66 ± 0,75	0,202	1,79 ± 0,81	2,05 ± 1,08	0,283	1,88 ± 0,97	2,43 ± 1,43	0,068
j	11,52 ± 5,00	12,38 ± 5,43	0,368	12,46 ± 3,54	11,68 ± 6,29	0,567	9,51 ± 5,08	11,47 ± 4,39	0,005*	10,53 ± 4,45	12,44 ± 4,67	0,011*

Nota: * significativo para um valor de P<0,05.

4.2.3. Variações na composição da saliva induzidas pela visualização, corrigidas para o efeito das imagens no “desejo de ingerir”

Tendo em conta que o desejo de ingerir induzido pelas imagens não é o mesmo para todas, e tendo em conta que a resposta salivar pode depender da sensação que a imagem desencadeia, o desejo de ingerir que as pessoas reportaram sentir para a ingestão do alimento representado em cada imagem, foi considerado como possível covariável.

Observa-se que o efeito desta covariável apenas é significativo para as bandas c (amílase – forma glicosilada; $P=0,013$), d (amílase – forma nativa; $P=0,029$), g (n.i.; $P=0,028$) e h (cadeia de Ig; $P=0,027$) (Anexo 4). Ou seja, o efeito da visualização das imagens nas % volume dessas bandas proteicas é afetado pelo desejo de ingerir que cada uma dessas imagens desencadeia.

Voltando a comparar o período antes, com o período durante a visualização das imagens, mas considerando o “desejo de ingerir” como covariável, para o caso destas bandas, onde esta covariável tem efeito significativo, observou-se que o decréscimo na banda c (amílase – forma glicosilada), que apenas é significativo durante a visualização da salada, enquanto, no caso da banda d (amílase – forma nativa), tanto a salada como a pizza provocam diminuições significativas. A banda g (n.i.) aumenta significativamente durante a observação de pizza, e a banda h (cadeia de Ig) não apresenta variações significativas com a visualização de nenhuma das imagens alimentares (Tabela 10).

De realçar que a análise, usando o “desejo de ingerir” como covariável, apenas foi realizada para as imagens alimentares, uma vez que não fazia sentido avaliar este tipo de sensação no caso da imagem controlo (carro).

Tabela 10: Comparação dos níveis (% Volume) (média ± desvio padrão) das bandas proteicas, entre antes e durante a visualização, para as diferentes imagens alimentares considerando o “desejo de ingerir” como variável.

Bandas	Pizza			Bolo			Salada		
	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P	Antes	Durante	P
c	12,04 ± 3,29	11,25 ± 2,52	0,354	12,15 ± 3,02	11,66 ± 2,87	0,073	12,28 ± 2,97	11,67 ± 2,81	0,027*
d	14,66 ± 5,31	12,97 ± 5,75	0,025*	14,29 ± 6,38	13,66 ± 5,58	0,660	15,63 ± 8,47	13,25 ± 6,27	0,023*
g	1,35 ± 0,55	1,45 ± 0,58	0,047*	1,30 ± 0,48	1,65 ± 0,73	0,285	1,62 ± 0,62	1,27 ± 0,47	0,578
h	2,19 ± 1,29	1,99 ± 1,02	0,104	1,93 ± 0,93	1,66 ± 0,75	0,065	1,79 ± 0,81	2,05 ± 1,08	0,737

Nota: * significativo para um valor de P<0,05.

4.3. Relação entre as alterações na salivação ou perfil proteico salivar e as sensações / emoções desencadeadas pelas imagens

Uma das hipóteses colocadas é que as alterações salivares se devam ao tipo de sensação / emoção que a visualização das imagens desencadeia. Por esse motivo, as variações na salivação (considerando a diferença entre o parâmetro na saliva recolhida durante a visualização, e o parâmetro na saliva recolhida antes da visualização) foram correlacionadas com as sensações desencadeadas pelas imagens.

Tal como referido anteriormente, não havendo possibilidade de avaliar emoções que se aplicassem simultaneamente a imagens alimentares e não alimentares, esta análise só é feita considerando as três imagens alimentares.

Fazendo uma análise univariada, ou seja, em que a variação de cada banda proteica é correlacionada individualmente com cada uma das sensações / emoções (Tabela 11), a sensação de água na boca está moderadamente correlacionada com a variação na banda d (amílase – forma nativa), enquanto que, a sensação de excitação está positiva e moderadamente correlacionada com a variação nas bandas b1 (n.i.) e d (amílase – forma nativa), estando também correlacionada positivamente com as variações na banda c (amílase – forma glicosilada) mas, neste caso, de forma fraca. A ansiedade apresenta uma correlação significativa positiva com as bandas a1 (n.i.) e b1 (n.i.) e negativa com as bandas h2 (n.i.) e j (cistatinas). A sensação de felicidade está positivamente correlacionada com a variação nas bandas b1 (n.i.), c1 (n.i.), c (amílase-forma glicosilada) e d (amílase- forma nativa). Por sua vez a sensação de repulsa correlaciona-se positivamente com a banda h2 (n.i.) e negativamente com a banda j (cistatinas). Todas as correlações univariadas estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11: Correlação entre as bandas proteicas e as sensações / emoções desencadeadas pela visualização das imagens alimentares.

Bandas	Parâmetros	Apetite específico	Desejo	Água na boca	Bem-estar	Excitação	Ansiedade	Felicidade	Repulsa	Indiferença
Δa	Correlação de Pearson	-,171	-,095	-,037	,052	,055	-,015	,108	-,008	,147
	Valor de P	,217	,495	,791	,710	,691	,916	,435	,957	,290
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
$\Delta a1$	Correlação de Pearson	-,019	,011	,012	,046	,039	,269*	,152	-,009	,005

	Valor de P	,889	,935	,930	,742	,778	,049	,273	,951	,970
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ b1	Correlação de Pearson	,119	,250	,269*	,260	,444**	,279*	,441**	,002	-,138
	Valor de P	,390	,069	,049	,058	,001	,041	,001	,988	,320
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ b	Correlação de Pearson	-,53	,028	,175	,029	,129	,000	,150	-,046	,101
	Valor de P	,705	,842	,206	,833	,352	,999	,278	,740	,467
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ c1	Correlação de Pearson	,013	,038	,128	,238	,261	,061	,321*	,026	,037
	Valor de P	,928	,783	,355	,083	,056	,659	,018	,851	,789
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ c	Correlação de Pearson	,046	,094	,166	,139	,269*	,080	,276*	-,130	-,031
	Valor de P	,740	,497	,230	,318	,049	,566	,043	,348	,824
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ d	Correlação de Pearson	,144	,309*	,337*	,269*	,440**	,194	,481**	-,172	-,198
	Valor de P	,299	,023	,013	,049	,001	,160	,000	,213	,151
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e	Correlação de Pearson	-,160	-,125	-,008	-,050	,063	,072	,091	-,029	-,118
	Valor de P	,248	,368	,953	,719	,651	,603	,515	,835	,397
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e1	Correlação de Pearson	,025	,003	,018	-,015	,169	,223	,147	-,009	-,110
	Valor de P	,856	,983	,900	,917	,221	,105	,290	,948	,430
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e2	Correlação de Pearson	-,097	-,016	,008	,033	,173	,053	,228	,030	,121
	Valor de P	,487	,909	,953	,815	,212	,704	,097	,828	,385
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e3	Correlação de Pearson	-,093	-,010	,071	,134	-,016	,041	,220	-,020	,227
	Valor de P	,502	,944	,609	,333	,906	,768	,110	,885	,099
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e4	Correlação de Pearson	-,169	-,058	,024	-,020	,142	-,029	,200	-,011	,213
	Valor de P	,223	,677	,866	,884	,305	,837	,147	,938	,122
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ e5	Correlação de Pearson	-,053	,026	,120	,086	,256	,147	,321*	-,090	,013
	Valor de P	,702	,852	,389	,538	,062	,290	,018	,516	,927
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ f	Correlação de Pearson	,104	,033	,051	-,171	,074	-,043	,033	,006	-,071
	Valor de P	,455	,812	,716	,216	,597	,758	,813	,963	,612
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ g	Correlação de Pearson	-,117	-,125	,018	,128	,145	,069	,111	-,029	,023

	Valor de P	,398	,367	,896	,356	,295	,621	,423	,837	,870
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ -h	Correlação de Pearson	-,139	-,135	-,095	,062	,002	-,068	,152	,110	,058
	Valor de P	,318	,329	,494	,654	,987	,627	,271	,430	,679
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ h	Correlação de Pearson	-,195	-,129	,003	,138	,088	-,041	,175	,001	,130
	Valor de P	,157	,352	,981	,318	,528	,768	,205	,994	,349
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ h1	Correlação de Pearson	-,234	-,154	-,083	,071	-,003	-,119	,234	,119	,183
	Valor de P	,088	,266	,552	,611	,986	,391	,088	,390	,186
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ h2	Correlação de Pearson	-,092	-,184	-,211	-,115	-,175	-,303*	,024	,279*	,231
	Valor de P	,506	,182	,126	,407	,207	,026	,866	,041	,092
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ i1	Correlação de Pearson	-,330*	-,221	-,208	-,051	-,090	-,148	,200	,364**	,296*
	Valor de P	,015	,109	,131	,716	,518	,284	,147	,007	,030
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ i2	Correlação de Pearson	-,084	-,086	-,047	-,206	-,112	-,160	,031	,099	,061
	Valor de P	,544	,535	,734	,135	,418	,247	,823	,475	,660
	N	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Δ j	Correlação de Pearson	-,059	-,052	-,044	-,034	-,066	-,356*	-,095	-,376**	-,124
	Valor de P	,686	,720	,760	,814	,647	,011	,511	,007	,393
	N	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Nota: * significativo e correlação fraca; ** significativo e correlação moderada; valores a negrito correspondem a valores de $P < 0,05$; Δ – variação (diferença entre o valor do parâmetro na saliva recolhida durante a visualização e o valor do parâmetro na saliva recolhida antes da visualização); laranja – correlação significativa negativa; verde – correlação significativa positiva.

À semelhança do que foi feito anteriormente, em relação às preferências gustativas, também para as variáveis sensações / emoções foi feita uma PCA, no sentido de reduzir o total de emoções analisadas a um número mais baixo de variáveis, com significado biológico.

Através desta análise foi possível obter um modelo com uma elevada adequação ($KMO=0,863$; $P=0,0005$) e com duas componentes capazes de explicar um total de 64,8% da variância dos dados. Essas componentes distinguiram-se pelos tipos de sensações / emoções que mais contribuem para cada, sendo a componente 1 denominada de “emoções positivas” e a componente 2 de “emoções negativas” (Tabela 12).

Tabela 12: Peso das diferentes variáveis para cada uma das componentes (rotação varimax).

Rotação varimax		
Sensação / emoção	Componente	
	1	2
Apetite específico pelo alimento	,704	-,539
Desejo	,809	-,454
Água na boca	,810	-,354
Bem-estar	,570	
Excitação	,872	
Ansiedade	,514	
Felicidade	,862	
Repulsa		,814
Indiferença	-,453	,594

Usando estas 2 componentes como “novas” variáveis e correlacionando-as com a variação de volume, verificou-se que esta se correlaciona negativamente com os sentimentos negativos e positivamente com os sentimentos positivos. Já no que diz respeito à variação da concentração, não se observaram correlações significativas com nenhuma das variáveis. Relativamente à correlação com as diferentes bandas proteicas, são as bandas b1 (n.i.) e d (amílase – forma nativa) que estão correlacionadas com as emoções positivas, sendo essas correlações positivas e moderadas. Por sua vez, a banda i1 (proteoforma de PIP) está positivamente correlacionada com as emoções negativas e a banda j (cistatinas) está negativamente correlacionada com estas (Tabela 13).

Tabela 13: Correlação entre a variação no volume, concentração e nas bandas proteicas considerando “emoções positivas” e “emoções negativas” como variáveis.

Componente	Parâmetros	Δ volume	Δ concentração	Δa	Δa1	Δb1	Δb	Δc1	Δc	Δd	Δe	Δe1	Δe2	Δe3	Δe4	Δe5	Δf	Δg	Δ-h	Δh	Δh1	Δh2	Δi1	Δi2	Δj
Emoções positivas	Correlação de Pearson	,201*	-,091	,013	,114	,424**	,102	,237	,214	,423**	,010	,128	,114	,088	,059	,205	,011	,074	,003	,051	,007	-,160	-,065	-,106	-,178
	P	,031	,547	,924	,412	,001	,462	,084	,120	,001	,942	,356	,412	,527	,672	,138	,937	,594	,982	,717	,959	,247	,638	,448	,215
	N	116	46	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	50
Emoções negativas	Correlação de Pearson	-,192*	-,052	,165	,144	,124	,070	,164	,033	-,013	,064	,075	,192	,190	,194	,141	-,089	,143	,169	,195	,256	,155	,407**	,022	-,322*
	P	,039	,732	,232	,300	,371	,617	,235	,811	,923	,647	,588	,165	,169	,159	,311	,520	,304	,223	,158	,062	,264	,002	,874	,023
	N	116	46	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	50

Nota: * significativo e correlação fraca; ** significativo e correlação moderada; valores a negrito correspondem a valores de P<0,05; Δ – variação (diferença entre o valor do parâmetro na saliva recolhida durante a visualização e o valor do parâmetro na saliva recolhida antes da visualização); laranja – correlação significativa negativa; verde – correlação significativa positiva.

4.4. Efeito da visualização das imagens de alimentos no perfil eletroforético bidimensional

De modo a avaliar o efeito da visualização de alimentos, no perfil eletroforético bidimensional, foram constituídos *pools*. Neste caso, consideraram-se três situações: situação controlo (visualização da imagem não alimentar), visualização do alimento palatável doce (bolo) com efeito em termos de desejo / salivação e visualização do mesmo alimento palatável doce (bolo), mas sem efeito em termos de desejo / salivação.

Comparando os valores dos volumes normalizados dos *spots* durante as diferentes visualizações, através de ANOVA, observam-se diferenças significativas nos níveis de expressão de onze *spots* (Tabela 14; Figura 11). Destes, sete foram observados com os níveis mais elevados durante a visualização do bolo, que induziu maior reação, e com os níveis mais baixos durante a visualização do carro. Já no caso de três *spots* (280, 299 e 300), a visualização do bolo, para os indivíduos a quem induziu maiores reações, resultou nos níveis mais baixos destes *spots*. O *spot* 279, por sua vez, foi observado com os níveis mais elevados na observação do bolo, por parte dos indivíduos a quem esta imagem não induziu grande reação de desejo / salivação.

Para além destes, ainda se observaram treze *spots* com tendência a variação entre condições em que a visualização de bolo produz “desejo / salivação” e a visualização de uma imagem não alimentar, ou quando o bolo não desencadeia reação de desejo / salivação (Figura 11).

Tabela 14: Valores de volume normalizado (média \pm desvio padrão) dos spots diferencialmente expressos na saliva secretada em resposta a diferentes estímulos visuais.

Spot	Carro	Bolo (+)	Bolo (-)	P	Valor mais elevado	Valor mais baixo
94	$260,8 \times 10^4 \pm 43,8 \times 10^4$	$453,5 \times 10^4 \pm 166,6 \times 10^4$	$284,9 \times 10^4 \pm 40,4 \times 10^4$	0,0408	Bolo (+)	Carro
106	$166,5 \times 10^4 \pm 62,4 \times 10^4$	$368,0 \times 10^4 \pm 77,0 \times 10^4$	$336,9 \times 10^4 \pm 29,4 \times 10^4$	0,0025	Bolo (+)	Carro
161	$175,9 \times 10^4 \pm 46,6 \times 10^4$	$339,3 \times 10^4 \pm 129,5 \times 10^4$	$194,8 \times 10^4 \pm 38,0 \times 10^4$	0,0272	Bolo (+)	Carro
201	$39,9 \times 10^4 \pm 10,0 \times 10^4$	$70,3 \times 10^4 \pm 26,9 \times 10^4$	$33,6 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	0,0361	Bolo (+)	Carro
205	$57,5 \times 10^4 \pm 11,2 \times 10^4$	$125,3 \times 10^4 \pm 38,3 \times 10^4$	$75,1 \times 10^4 \pm 16,8 \times 10^4$	0,0042	Bolo (+)	Carro
279	$649,4 \times 10^4 \pm 43,8 \times 10^4$	$698,0 \times 10^4 \pm 157,8 \times 10^4$	$1007,1 \times 10^4 \pm 194,5 \times 10^4$	0,0286	Bolo (-)	Carro
280	$526,9 \times 10^4 \pm 24,7 \times 10^4$	$335,5 \times 10^4 \pm 85,7 \times 10^4$	$505,7 \times 10^4 \pm 39,9 \times 10^4$	0,0056	Carro	Bolo (+)
299	$81,8 \times 10^4 \pm 23,3 \times 10^4$	$48,8 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^4$	$83,3 \times 10^4 \pm 32,3 \times 10^4$	0,0319	Bolo (-)	Bolo (+)
300	$104,4 \times 10^4 \pm 8,6 \times 10^4$	$62,9 \times 10^4 \pm 14,7 \times 10^4$	$99,2 \times 10^4 \pm 31,6 \times 10^4$	0,0191	Carro	Bolo (+)
315	$214,8 \times 10^4 \pm 48,5 \times 10^4$	$479,4 \times 10^4 \pm 145,1 \times 10^4$	$388,8 \times 10^4 \pm 21,7 \times 10^4$	0,0033	Bolo (+)	Carro
319	$179,4 \times 10^4 \pm 40,1 \times 10^4$	$424,5 \times 10^4 \pm 212,9 \times 10^4$	$416,7 \times 10^4 \pm 29,4 \times 10^4$	0,0156	Bolo (+)	Carro

Nota: Os símbolos (+) e (-) indicam o efeito da visualização, de desejo/salvação, ou a ausência de efeito, respectivamente. Laranja – marcação de spots para os quais os valores são mais baixos quando a visualização do bolo provoca maior reação; verde – marcação dos spots para os quais os valores são mais elevados quando a visualização do bolo provoca maior reação.

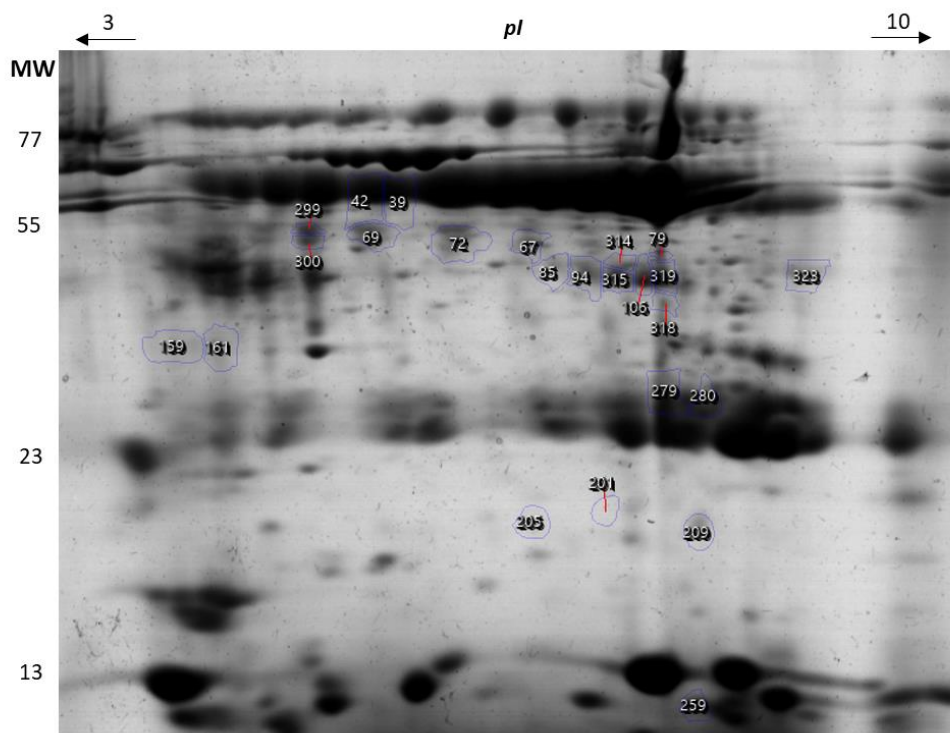


Figura 11: Perfil 2-DE representativo das amostras de saliva mista. Os *spots* assinalados são aqueles para os quais se observaram diferenças entre estímulos visuais. MW – Massas moleculares (kDa); *pI* – ponto isoelétrico.

À semelhança do que foi realizado anteriormente, ou seja, por comparação com outros trabalhos realizados para a saliva humana (ex. Jessie *et al.*, 2010; Rodrigues, 2017; Zallocco *et al.*, 2021), onde se procedeu à identificação de *spots* por espectrometria de massa, dos vinte e quatro *spots* analisados, foi possível identificar nove (Tabela 15).

Tabela 15: Identificação de *spots* de acordo com estudos realizados anteriormente para a saliva humana.

Spots	Identificação	Referência
39	<i>Ig alpha chain C</i>	(Zallocco <i>et al.</i> , 2021)
42	<i>Ig alpha chain C</i>	(Zallocco <i>et al.</i> , 2021)
67	n.i.	-
69	n.i.	-
72	n.i.	-
79	n.i.	-

85	Anidrase carbónica VI (CA VI)	(Rodrigues, 2017)
94	Anidrase carbónica VI (CA VI)	(Rodrigues, 2017)
106	Anidrase carbónica VI (CA VI)	(Rodrigues, 2017)
159	n.i.	-
161	<i>short-palate lung and nasal epithelium carcinoma associated protein 2 (SPLUNC)</i>	(Jessie <i>et al.</i> , 2010)
201	n.i.	-
205	n.i.	-
209	n.i.	-
259	n.i.	-
279	<i>Ig alpha1 chain C region</i>	(Jessie <i>et al.</i> , 2010)
299	n.i.	-
300	n.i.	-
314	n.i.	-
315	Anidrase carbónica VI (CA VI)	(Rodrigues, 2017)
318	n.i.	-
319	Anidrase carbónica VI (CA VI)	(Rodrigues, 2017)
323	n.i.	-

Nota: n.i. – não identificado.

Capítulo 5 | **Discussão**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da visualização de diferentes alimentos, associados a diferentes qualidades sensoriais, no desencadear de sensações / emoções e nas alterações provocadas na salivação, particularmente no perfil proteico salivar. Que seja do nosso conhecimento, é a primeira vez que são avaliadas alterações no proteoma salivar em resposta a estímulos visuais alimentares.

Este trabalho foi motivado pelos, já referidos, célebres trabalhos de Ivan Pavlov e, também, por outros trabalhos realizados pela equipa, entre os quais Carreira *et al.* (2020), onde foi demonstrado que o estímulo olfativo do pão, para além de aumentar a resposta salivar, era capaz de induzir alterações a nível do proteoma salivar.

Em suma, neste trabalho, foram apresentados quatro estímulos visuais dos quais, três alimentares e um não alimentar, este último usado como controlo. Os estímulos alimentares consistiram em imagens de alimentos: 1) palatável salgado tipo *fast-food* (pizza); 2) palatável doce (bolo de chocolate); 3) pouco palatável (salada). Foram recolhidas amostras de saliva mista, antes e durante a visualização de cada estímulo, que foram posteriormente analisadas.

Primeiramente avaliou-se o efeito da visualização das diferentes imagens alimentares na perceção subjetiva de sensações / emoções. Tendo em conta que as preferências sensoriais (preferências por alimentos doces, salgados, ácidos e / ou amargos) podem condicionar as preferências e hábitos alimentares (Liem & Russell, 2019), no presente trabalho foi recolhida informação sobre o nível de preferência por uma lista de alimentos sensorialmente diferentes. Os dados obtidos permitiram extrair duas componentes (ou variáveis latentes), consideradas como “preferência por saudável” e “preferência por palatável”. Observou-se interação significativa entre a variável “preferência por palatável” e as sensações / emoções desencadeadas, o que mostra que a preferência por alimentos palatáveis pode afetar a forma como as imagens foram percebidas pelos participantes. Assim, para minimizar o potencial efeito desta variação, a análise foi feita considerando esta variável de preferência como covariável. Observou-se que a imagem de pizza foi a que desencadeou mais “desejo de ingerir”, “água na boca” e “excitação” (relativamente à de salada). Por outro lado, foi a imagem de salada que desencadeou menores níveis de “ansiedade”, principalmente quando comparada com à imagem do bolo. As RFC podem resultar de um processo de aprendizagem (Smeets *et al.*, 2010). Teoricamente, os indivíduos aprendem a associar as propriedades sensoriais dos alimentos com as consequências metabólicas da ingestão dos mesmos. Como resultado desta aprendizagem, as propriedades sensoriais dão origem a expectativas sobre os alimentos e tornam-se sinais, que condicionam a

posterior seleção alimentar (Van Dongen *et al.*, 2012). São vários os trabalhos que já estudaram a resposta do cérebro à visualização de fotografias de alimentos que diferem entre si no conteúdo calórico (ex. Frank *et al.*, 2010; Killgore *et al.*, 2003). Estes demonstraram que várias regiões cerebrais foram ativadas de forma diferente, consoante o conteúdo calórico dos estímulos alimentares apresentados. Os resultados obtidos por Killgore *et al.* (2003) demonstraram que alimentos com alto conteúdo calórico produziram uma mudança significativa maior em regiões cerebrais envolvidas na emoção, motivação, seleção de respostas e regulação comportamental, comparativamente com alimentos pouco calóricos. A observação de que é a pizza que provoca maior “desejo de ingerir”, “água na boca” e “excitação”, principalmente em comparação com a salada, vai de encontro a estes resultados. A escolha entre alimentos pouco saudáveis e saudáveis é uma questão de autorregulação (Dohle *et al.*, 2018). A salada é o alimento considerado mais saudável, pelo que, o desencadear de menores níveis de ansiedade, como se observou neste estudo, faz sentido, pois, este alimento não é percebido como uma tentação, mas sim como o alimento “correto” para consumir. A associação entre alimento saudável e menor culpa foi já referida por outros autores (Spence *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao efeito da visualização das diferentes imagens na salivação, a taxa de secreção foi o primeiro parâmetro a ser avaliado e, contrariamente ao esperado, que seria ocorrer um aumento da salivação após a visualização das imagens alimentares, à semelhança do que ocorreu em Lai *et al.* (2021), este não se verificou. As visualizações das imagens alimentares não induziram variações significativas na taxa de secreção. A variação inter-individual, na reação às imagens, pode explicar esta falta de significância estatística. No estudo referido anteriormente, as imagens alimentares não foram visualizadas através de óculos de RV, o que pode indicar que os resultados obtidos podem não ter sido devido à imagem, mas sim, ao tipo de ensaio. O resultado obtido com a visualização da imagem controlo não alimentar (carro), vem ainda reforçar esta hipótese: a diminuição estatisticamente significativa observada na visualização da imagem controlo sugere que o facto de estar com os óculos de RV pode ter um efeito de *stress*. Esta potencial redução na quantidade de saliva produzida, aquando da utilização dos óculos, parece não se observar no momento da visualização dos alimentos, mostrando assim um efeito positivo das imagens de alimentos na quantidade de saliva produzida. Por questões logísticas, na recolha realizada antes da visualização, os indivíduos não tinham os óculos postos, o que podemos considerar como uma limitação e eventual fator a melhorar futuramente. Outra limitação que podemos identificar, e que pode ter tido impacto nestes resultados, foi a imagem controlo ter sido

sempre a última visualizada, portanto, outro aspeto a melhorar seria a visualização de todas as imagens aleatoriamente, e não só das alimentares.

A concentração proteica da saliva recolhida foi outro parâmetro avaliado, onde se verificaram diminuições significativas após a visualização tanto da pizza como da salada. Um decréscimo na concentração em proteína total pode dever-se a uma diminuição na quantidade de secreção de proteínas, por parte das glândulas e / ou a um aumento da secreção de água. Na linha de raciocínio referida anteriormente, em que parece haver uma resposta salivatória à visualização de imagens de alimentos, é possível que a pizza e a salada tenham sido as imagens que maior quantidade de saliva induziram, resultante de maior secreção de água para o total de saliva.

Relativamente à análise do perfil proteico unidimensional (SDS-PAGE), apenas se observou interação entre período e imagem numa banda proteica, a banda b1, para a qual não temos identificação da(s) proteína(s) que contém. Esta interação indica que a variação desta banda proteica não acontece da mesma forma (ou seja, no mesmo sentido) para todas as imagens. Esta proteína aumentou só no caso da visualização da pizza. Este alimento provocou também aumentos na banda que contém albumina e diminuição nos níveis da banda que contém amilase (forma nativa).

É interessante notar que o efeito da visualização de imagens diferentes não foi o mesmo. No caso do bolo, só a banda contendo anidrase carbónica VI (CA VI) é que sofreu aumentos significativos. Esta é uma metaloproteína de zinco secretada pelas células acinares serosas. A sua produção é, assim, maioritariamente proveniente das glândulas parótidas e das glândulas salivares menores de Von Eber (Padiglia *et al.*, 2010). Esta proteína tem como principal função catalisar a reação reversível de dióxido de carbono a bicarbonato ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$), e acredita-se que é devido a esta função que a CA VI proporciona uma maior capacidade tampão à saliva (Frassetto *et al.*, 2012). Como já foi referido anteriormente, foi sugerido num estudo anterior, que a CA VI pode estar envolvida na sensibilidade pelo gosto doce (Rodrigues *et al.*, 2017b). Ainda que sejam necessários estudos futuros para clarificar o porquê do aumento desta banda proteica, em resposta à visualização da imagem do bolo de chocolate, pode colocar-se a hipótese de uma maior contribuição das glândulas parótidas, em resposta a este estímulo. A associação desta proteína à perceção oral do paladar doce sugere que as alterações, a nível salivar, induzidas pelo bolo de chocolate, possam vir a ter efeito na perceção da intensidade de doce. No entanto, esta hipótese necessita ser testada em estudos futuros.

No caso da salada, a visualização deste alimento produziu aumentos estatisticamente significativos nos níveis da banda contendo cistatinas. As cistatinas constituem uma super-família de proteínas, cuja principal função conhecida na saliva é a de proteger a cavidade oral ao inibir as proteases cisteína (Dickinson, 2002). Para além desta função, as cistatinas do tipo S têm sido associadas à percepção oral, nomeadamente à intensidade percebida de amargo (Rodrigues *et al.*, 2017a) e adstringência (Melis *et al.*, 2017). O aumento destas proteínas salivares, em resposta à ingestão de alimentos de origem vegetal, principalmente com níveis de compostos potencialmente anti-nutricionais (como taninos ou ácido fítico) foi observada nalguns estudos (ex. Delimont *et al.*, 2019; Louro *et al.*, 2021). Sendo a salada constituída por alimentos de origem vegetal, os resultados do nosso estudo sugerem que a observação desta imagem pode antecipar as características da mesma e levar ao aumento da secreção destas proteínas. De qualquer forma, esta hipótese terá que ser testada em trabalhos futuros.

As imagens alimentares não desencadeiam o mesmo efeito em todos os indivíduos. Por esse motivo, e pensando que um maior efeito em termos de vontade de ingerir o alimento em causa, pode provocar maiores alterações na salivacção, foi avaliado o efeito dos estímulos visuais na salivacção, corrigindo para o “desejo de ingerir o alimento específico”, através da utilização deste parâmetro como covariável. Observou-se um decréscimo dos níveis das bandas de amílase (glicosilada e nativa) durante a visualização da salada, e apenas da banda de amílase nativa durante a visualização da pizza. Durante a visualização da pizza, observou-se também um aumento de uma banda proteica não identificada (banda g). É interessante observar este efeito diferente, entre os diferentes alimentos, em relação às formas de amílase. A amílase salivar é sintetizada e secretada pelas células acinares, existindo em maior proporção na saliva proveniente das glândulas parótidas, comparativamente às restantes glândulas salivares. A existência de diferentes proteoformas de amílase, na saliva, já está bem documentada (Contreras-Aguilar *et al.*, 2020). Ainda que a ativação do sistema nervoso autónomo esteja associado a um aumento dos níveis de amílase salivar, a proporção das diferentes proteoformas, em resposta a esta, não é a mesma (Contreras-Aguilar *et al.*, 2020). Assim, esta diminuição no total de amílase, induzida pela visualização de salada e a diminuição apenas na forma nativa, no caso da pizza, pode indicar ativações diferentes, por parte destas duas imagens.

O presente trabalho é inovador no que diz respeito à avaliação dos potenciais efeitos da visualização de alimentos na salivacção e proteoma salivar. Por esse motivo, há poucos estudos que permitam concluir se a existência de efeitos se deve a uma

antecipação daquele alimento em particular, ou se, antes, às sensações / emoções que a visualização da imagem do alimento desencadeia, independentemente do tipo de alimento em causa. Assim, foi analisada a relação entre o perfil proteico salivar e as sensações / emoções desencadeadas pelas imagens. Através de uma análise de componentes principais, foi possível agrupar as emoções em duas componentes, positivas e negativas. Curiosamente, duas bandas demonstraram estar positivamente correlacionadas com emoções positivas: uma banda não identificada (banda b1), e a banda correspondente à forma nativa de amílase. Ou seja, ocorre um maior aumento ao nível destas proteínas, quanto mais positivas são as sensações desencadeadas pelo alimento. Num estudo realizado anteriormente, Adam *et al.* (2011), estudaram a associação entre estados de humor momentâneos e os níveis de α -amílase salivar em adolescentes. Estes observaram um aumento agudo da proteína associado a emoções positivas de elevada excitação (ex. sentir-se forte, ativo, excitado). Em situações de ativação de sistema nervoso simpático há aumentos de amílase, conforme referido anteriormente. Estes aumentos de atividade do ramo simpático, do sistema nervoso autónomo, e de níveis de amílase salivar foram já sugeridos como existindo durante a fase cefálica de ingestão (Harthoorn & Dransfield, 2008), indicando maior ativação simpática associada a maiores níveis de sensações / emoções positivas.

Por outro lado, também houve bandas que se correlacionaram com emoções negativas. As proteoformas de PIP, estão positivamente correlacionadas com estas, enquanto que as cistatinas, correlacionam-se negativamente. Alguns trabalhos sugerem que o *stress* agudo pode aumentar a libertação de proteínas salivares relevantes para a imunidade (ex. Bosch *et al.*, 2003; Trueba *et al.*, 2012). As PIP são proteínas que estão envolvidas em processos de imunidade (Ugorski, & Dziejel, 2018). Trueba *et al.* (2012), relataram um aumento destas proteínas na sequência de um *Trier Social Stress Test*, um evento que desencadeou *stress* psicossocial agudo. No entanto, estudos mais recentes não encontraram o mesmo resultado (Zallocco *et al.*, 2021). As cistatinas são proteínas salivares associadas a estímulos aversivos, como o amargor ou a adstringência, como foi referido anteriormente. Este aumento com as emoções negativas pode indicar uma maior indução da secreção destas proteínas em resposta a estímulos aversivos. Este resultado também pode indicar que há menor ativação das glândulas parótidas e / ou maior ativação das submandibulares quando as imagens desencadeiam sensações / emoções mais negativas, uma vez que as cistatinas salivares são proteínas encontradas principalmente na saliva produzidas pelas submandibulares.

O volume de saliva também demonstrou estar correlacionado com as emoções, estando aumentado quando foram relatadas emoções positivas, e diminuído quando se tratava de emoções negativas.

De modo a complementar e aprofundar a informação acerca das alterações, no proteoma salivar, induzidas pela observação de imagens de alimentos, foram analisados perfis eletroforéticos bidimensionais de saliva obtida em resposta à visualização do bolo. Neste caso, e tendo em conta que esta imagem não induziu a mesma reação a todas as pessoas, comparou-se o perfil proteico salivar de participantes a quem a visualização do bolo induziu uma reação mais forte, quer em termos de sensações / emoções positivas, quer em termos de volume de saliva total, com a de participantes a quem a visualização do bolo não causou muito desejo nem produção de saliva total. Os resultados vão no sentido daqueles observados através dos perfis unidimensionais, os quais mostraram aumentos dos níveis de CA VI induzidos pela imagem do bolo. Olhando para os *spots* de CA VI aumentados, conclui-se que este aumento parece ocorrer para as formas com diferentes pontos isoelétricos e não para uma proteoforma específica. Foram já identificadas várias proteoformas de CA VI, as quais são glicosiladas nos resíduos Asn67 e Asn256, com diferentes grupos glucídicos (Yrjänäinen *et al.*, 2022), sendo estas glicosilações responsáveis pelas pequenas diferenças de massa e ponto isoelétrico. Ainda que este seja um assunto ainda pouco estudado, no caso da CA VI, é expectável que diferentes glicosilações estejam associadas a diferentes funções. É interessante confirmar que os efeitos se observam nos indivíduos que reportaram mais desejo por ingerir o bolo e que salivaram mais e não nos indivíduos a quem a imagem de bolo de chocolate não produziu este efeito. Isto vem reforçar a ideia de que as respostas salivares, em resposta a estímulos pré-ingestivos, se associem mais a uma resposta emocional / afetiva do que a uma associação cognitiva ao tipo de alimento em causa.

A identificação das proteínas presentes nalguns dos *spots* proteicos, observados como estando alterados em resposta à visualização da imagem de bolo de chocolate, não é possível com base nas identificações feitas em estudos anteriores. Assim, é de interesse identificar estas proteínas, no futuro, de modo a compreender melhor o efeito deste tipo de estímulo.

A análise, através de proteómica bidimensional, apenas foi realizada a amostras representando *pools* de indivíduos pelo volume limitante de amostra, nalguns casos, para conseguir o total de proteína necessário. Por esse motivo, também não se conseguiria muita informação ao tratar a variação na salivação entre antes e durante

estimulação, como se fez para os dados obtidos através das outras técnicas. Isto porque trabalhando com *pools* as análises pareadas têm menos significado. Por esse motivo, a comparação entre condições visuais foi só feita para a saliva recolhida durante a visualização.

Para além das limitações já referidas, há que considerar mais algumas limitações no presente estudo. Nomeadamente a falta de medidas objetivas psicofisiológicas, como medidas de atividade cerebral e / ou medidas de ativação dos ramos do sistema nervoso simpático (ex. condutância da pele, variabilidade da taxa cardíaca – *heart rate variability*, entre outros). Estudos futuros em que estas medidas possam ser usadas são importantes para esclarecer os mecanismos neurofisiológicos que podem estar na base destas alterações. Finalmente, há que ter em conta que os estímulos visuais apresentados foram imagens e não alimentos reais, e que na presença de alimentos reais os resultados poderão ser diferentes.

Capítulo 6 | **Conclusão**

O presente trabalho foi importante para compreender o efeito dos estímulos visuais alimentares. Os resultados obtidos parecem suportar que imagens de alimentos são capazes de desencadear sensações / emoções e de provocar alterações a nível do proteoma salivar.

Para além disso, a visualização de alimentos associados a diferentes qualidades sensoriais, resultaram em diferentes efeitos, tanto a nível emocional como a nível do perfil proteico. A visualização do alimento pouco palatável (saudável) foi a que despoletou menores níveis de ansiedade, especialmente quando comparada com o alimento palatável doce, enquanto que a visualização do alimento palatável salgado do tipo *fast-food* foi responsável pelo desencadear de maiores níveis de excitação, desejo de ingerir e “água na boca”, quando comparado com o alimento pouco palatável. A visualização do alimento palatável doce resultou num aumento de CA VI, enquanto a visualização do alimento pouco palatável (saudável) levou a um aumento das cistatinas. A visualização dos alimentos palatáveis doce e salgado *fast-food* resultaram em respostas diferentes ao nível de duas formas de amílase.

Também foi possível encontrar uma associação entre as alterações no proteoma salivar e as emoções desencadeadas. Emoções positivas correlacionaram-se positivamente com amílase, enquanto as emoções positivas, correlacionaram-se positivamente com proteoformas de PIP e, negativamente, com bandas que continham cistatinas.

Futuramente, será interessante proceder à identificação das proteínas, que não foram identificadas no presente trabalho, de modo a melhor caracterizar e compreender as alterações verificadas. Também será interessante a adição de medidas objetivas psicofisiológicas, de modo a esclarecer os mecanismos neurofisiológicos que possam estar na base destas alterações.

Referências Bibliográficas

- Adam, E. K., Till Hoyt, L., & Granger, D. A. (2011). Diurnal alpha amylase patterns in adolescents: Associations with puberty and momentary mood states. *Biological Psychology*, *88*(2–3), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2011.07.007>
- Amado, F. M. L., Ferreira, R. P., & Vitorino, R. (2013). One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clinical Biochemistry*, *46*(6), 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.024>
- Aps, J. K. M., & Martens, L. C. (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, *150*(2–3), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>
- Barbosa, E. B., Vidotto, A., Polachini, G. M., Henrique, T., Bernadete, A., de Marqui, T., & Tajara, E. H. (2012). Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, *58*(3), 366–375.
- Benn, A., Murray Thomson, W., M L, B. A., M, T. W., Murray Thomson, P. W., & John Walsh, S. (2014). Saliva: an overview. *New Zealand Dental Journal*, 92–96. <https://www.researchgate.net/publication/266325549>
- Bosch, J. A., De Geus, E. J. C., Veerman, E. C. I., Hoogstraten, J., & Nieuw Amerongen, A. V. (2003). Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosomatic Medicine*, *65*(2), 245–258. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000058376.50240.2D>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).
- Cabras, T., Melis, M., Castagnola, M., Padiglia, A., Tepper, B. J., Messana, I., & Barbarossa, I. T. (2012). Responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP) is associated with salivary levels of two specific basic proline-rich proteins in humans. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030962>
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, *4*(1), 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>

- Carreira, L., Castelo, P. M., Simões, C., Capela E Silva, F., Viegas, C., & Lamy, E. (2020). Changes in salivary proteome in response to bread odour. *Nutrients*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/nu12041002>
- Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M. T., & Messana, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in Biotechnology*, *29*(8), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.002>
- Contreras-Aguilar, M. D., & Gómez-García, F. (2020). Chapter 1 Salivary Glands' Anatomy and Physiology. In A. Tvarijonaviciute, S. Martínez-Subiela, P. Pia López-Jornet, & E. Lamy (Eds.), *Saliva in Health and Disease* (Issue 9, pp. 3–21). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>
- Contreras-Aguilar, M. D., Vialaret, J., Deville de Périère, D., Escribano, D., Lehmann, S., Tecles, F., Cerón, J. J., & Hirtz, C. (2020). Variation of human salivary alpha-amylase proteoforms in three stimulation models. *Clinical Oral Investigations*, *24*(1), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03021-9>
- Criado, C., Chaya, C., Fernández-Ruiz, V., Álvarez, M. D., Herranz, B., & Pozo-Bayón, M. Á. (2019). Effect of saliva composition and flow on inter-individual differences in the temporal perception of retronasal aroma during wine tasting. *Food Research International*, *126*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108677>
- de Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. Â. N., de Lima, A. A. S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *9*(3), 1–11.
- De Wijk, R. A., Prinz, J. F., Engelen, L., & Weenen, H. (2004). The role of α -amylase in the perception of oral texture and flavour in custards. *Physiology and Behavior*, *83*(1 SPEC. ISS.), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.07.014>
- Delimont, N. M., Katz, B. B., Fiorentino, N. M., Kimmel, K. A., Haub, M. D., Rosenkranz, S. K., Tomich, J. M., & Lindshield, B. L. (2019). *Salivary Cystatin SN Binds to Phytic Acid In Vitro and Is a Predictor of Nonheme Iron Bioavailability with Phytic Acid Supplementation in a Proof of Concept Pilot Study*. <http://www.mmass.org>
- Dickinson, D. P. (2002). SALIVARY (SD-TYPE) CYSTATINS: OVER ONE BILLION YEARS IN THE MAKING—BUT TO WHAT PURPOSE? *Crit Rev Oral Biol Med*, *13*(6), 485–508.
- Dinnella, C., Recchia, A., Vincenzi, S., Tuorila, H., & Monteleone, E. (2010). Temporary modification of salivary protein profile and individual responses to repeated phenolic

- astringent stimuli. *Chemical Senses*, 35(1), 75–85.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjp084>
- Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: A review. *Journal of Dentistry*, 33(3 SPEC. ISS.), 223–233.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>
- Dohle, S., Diel, K., & Hofmann, W. (2018). Executive functions and the self-regulation of eating behavior: A review. In *Appetite* (Vol. 124, pp. 4–9). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.05.041>
- Dsamou, M., Palicki, O., Septier, C., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chagnon, M. C., & Morzel, M. (2012). Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chemical Senses*, 37(1), 87–95. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr070>
- Esteves, C. V., de Campos, W. G., de Souza, M. M., Lourenço, S. V., Siqueira, W. L., & Lemos-Júnior, C. A. (2019). Diagnostic potential of saliva proteome analysis: A review and guide to clinical practice. *Brazilian Oral Research*, 33. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0043>
- Fábián, T. K., Beck, A., Fejérdy, P., Hermann, P., & Fábián, G. (2015). Molecular mechanisms of taste recognition: Considerations about the role of saliva. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5945–5974.
<https://doi.org/10.3390/ijms16035945>
- Franco-Martínez, L., Rubio, C. P., & Contreras-Aguilar, M. D. (2020). Chapter 4 Methodology Assays for the Salivary Biomarkers' Identification and Measurement. In A. Tvarijonaviciute, S. Martínez-Subiela, P. López-Jornet, & E. Lamy (Eds.), *Saliva in Health and Disease* (Issue 9, pp. 77–82). Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>
- Frank, S., Laharnar, N., Kullmann, S., Veit, R., Canova, C., Hegner, Y. L., Fritsche, A., & Preissl, H. (2010). Processing of food pictures: Influence of hunger, gender and calorie content. *Brain Research*, 1350, 159–166.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.030>
- Frassetto, F., Parisotto, T. M., Peres, R. C. R., Marques, M. R., Line, S. R. P., & Nobre Dos Santos, M. (2012). Relationship among salivary carbonic anhydrase vi activity and flow rate, biofilm ph and caries in primary dentition. *Caries Research*, 46(3), 194–200. <https://doi.org/10.1159/000337275>

- Gonçalves, L. D. R., Soares, M. R., Nogueira, F. C. S., Garcia, C., Camisasca, D. R., Domont, G., Feitosa, A. C. R., Pereira, D. de A., Zingali, R. B., & Alves, G. (2010). Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of Proteomics*, 73(7), 1334–1341. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.02.018>
- Guedes, D., Prada, M., Lamy, E., & Garrido, M. v. (2023). Sweet music influences sensory and hedonic perception of food products with varying sugar levels. *Food Quality and Preference*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104752>
- Guichard, E., Repoux, M., Qannari, E. M., Laboure, H., & Feron, G. (2017). Model cheese aroma perception is explained not only by in vivo aroma release but also by salivary composition and oral processing parameters. *Food and Function*, 8(2), 615–628. <https://doi.org/10.1039/c6fo01472k>
- Harthoorn, L. F., & Dransfield, E. (2008). Periprandial changes of the sympathetic-parasympathetic balance related to perceived satiety in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 102(5), 601–608. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0622-5>
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *THE JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. In *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (Vol. 6, Issue 1, pp. 67–76). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- Jessie, K., Pang, W. W., Rahim, Z. H. A., & Hashim, O. H. (2010). Proteomic analysis of whole human saliva detects enhanced expression of interleukin-1 receptor antagonist, thioredoxin and lipocalin-1 in cigarette smokers compared to non-smokers. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4488–4505. <https://doi.org/10.3390/ijms11114488>
- Júnior, R. Q. B., Martins, G. R., Barroso, I. C., Marinho, R. C., Aguiar, T. D. de F., & Teixeira, M. F. da S. (2013). ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ESPECTROMETRIA DE MASSA COMO FERRAMENTAS PROTEÔMICAS APLICADAS À DEFINIÇÃO DE MARCADORES PROTEICOS ASSOCIADOS À EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAPRINOS. In *Acta Veterinaria Brasilica* (Issue 2).

- Keesman, M., Aarts, H., Vermeent, S., Häfner, M., & Papies, E. K. (2016). Consumption simulations induce salivation to food cues. *PLoS ONE*, *11*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165449>
- Killgore, W. D. S., Young, A. D., Femia, L. A., Bogorodzki, P., Rogowska, J., & Yurgelun-Todd, D. A. (2003). Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. *NeuroImage*, *19*(4), 1381–1394. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00191-5)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.
- Lai, K., Liu, Y., He, Q., Yi, M., & Fujinami, T. (2021). *Saliva Secretion as Indicator of Appetite; Saliva Secretion as Indicator of Appetite*. <https://doi.org/10.1145/3472813>
- Lamy, E. C., Capela-Silva, F., Baptista, E. S., Graça, G., Costa, G., & Coelho, A. v. (2007). Utilização da proteômica para compreender o comportamento de ingestão. *Revista de Ciências Agrárias*, *30*(1), 367–374. <https://www.researchgate.net/publication/262632728>
- Lamy, E., Torregrossa, A.-M., Castelo, P. M., & Capela e Silva, F. (2020). Chapter 2 Saliva in Ingestive Behavior Research: Association with Oral Sensory Perception and Food Intake. In A. Tvarijonaviciute, S. Silvia Martínez-Subiela, P. López-Jornet, & E. Lamy (Eds.), *Saliva in Health and Disease* (Issue 9, pp. 24–48). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>
- Lasschuijt, M. P., Mars, M., de Graaf, C., & Smeets, P. A. M. (2020). Endocrine Cephalic Phase Responses to Food Cues: A Systematic Review. *Advances in Nutrition*, *11*(5), 1364–1383. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa059>
- Liem, D. G., & Russell, C. G. (2019). The Influence of Taste Liking on the Consumption of Nutrient Rich and Nutrient Poor Foods. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00174>
- Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H., & Okamoto, A. C. (2010). Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(3), e184–e188. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022>
- Louro, T., Simões, C., Lima, W., Carreira, L., Castelo, P. M., Luis, H., Moreira, P., & Lamy, E. (2021). Salivary Protein Profile and Food Intake: A Dietary Pattern Analysis. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/6629951>

- Mattes, R. D. (1997). Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(4), 406–413.
- Mattes, R. D. (2000). Nutritional implications of the cephalic-phase salivary response. *Appetite*, 34(2), 177–183. <https://doi.org/10.1006/appe.1999.0278>
- Melis, M., Yousaf, N. Y., Mattes, M. Z., Cabras, T., Messana, I., Crnjar, R., Tomassini Barbarossa, I., & Tepper, B. J. (2017). Sensory perception of and salivary protein response to astringency as a function of the 6-n-propylthioural (PROP) bitter-taste phenotype. *Physiology and Behavior*, 173, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.031>
- Morquecho-Campos, P., Bikker, F. J., Nazmi, K., de Graaf, K., Laine, M. L., & Boesveldt, S. (2019). Impact of food odors signaling specific taste qualities and macronutrient content on saliva secretion and composition. *Appetite*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104399>
- Morquecho-Campos, P., Bikker, F. J., Nazmi, K., de Graaf, K., Laine, M. L., & Boesveldt, S. (2020). A stepwise approach investigating salivary responses upon multisensory food cues. *Physiology and Behavior*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113116>
- Morzell, M., Truntzer, C., Neyraud, E., Brignot, H., Ducoroy, P., Lucchi, G., Canlet, C., Gaillard, S., Nicod, F., Nicklaus, S., Peretti, N., & Feron, G. (2017). Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children. *Physiology and Behavior*, 173, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.005>
- Mosca, A. C., & Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005>
- Naumann, E., Trentowska, M., & Svaldi, J. (2013). Increased salivation to mirror exposure in women with binge eating disorder. *Appetite*, 65, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.01.021>
- Nederkoorn, C., Smulders, F. T. Y., & Jansen, A. (2000). Cephalic phase responses, craving and food intake in normal subjects. *Appetite*, 35(1), 45–55. <https://doi.org/10.1006/appe.2000.0328>
- O'farrells, P. H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*. In *DF BIO~QKAL CHEMISTRY* (Vol. 250, Issue 10).

- Oppenheim, F. G., Salih, E., Siqueira, W. L., Zhang, W., & Helmerhorst, E. J. (2007). Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 22–50. <https://doi.org/10.1196/annals.1384.030>
- Padiglia, A., Zonza, A., Atzori, E., Chillotti, C., Calò, C., Tepper, B. J., & Barbarossa, I. T. (2010). Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(3), 539–545. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29418>
- Pagès-Hélary, S., Andriot, I., Guichard, E., & Canon, F. (2014). Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and α -amylase. *Food Research International*, 64, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.013>
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117–129. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>
- Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., & Indrak, K. (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Saliva as a Diagnostic Medium. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 153(2), 103–110.
- Power, M. L., & Schulkin, J. (2008). Anticipatory physiological regulation in feeding biology: Cephalic phase responses. *Appetite*, 50(2–3), 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2007.10.006>
- Prada, M., Rodrigues, D., Garrido, M. V., & Lopes, J. (2017). Food-pics-PT: Portuguese validation of food images in 10 subjective evaluative dimensions. *Food Quality and Preference*, 61, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.04.015>
- Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2016). Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 241, Issue 8, pp. 783–799). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1535370216638770>
- Roblegg, E., Coughran, A., & Sirjani, D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>
- Rodrigues, L., Costa, G., Cordeiro, C., Pinheiro, C., Amado, F., & Lamy, E. (2017). Salivary proteome and glucose levels are related with sweet taste sensitivity in

- young adults. *Food and Nutrition Research*, 61(1).
<https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1389208>
- Rodrigues, L. I. A. (2017). *O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa*. Universidade de Évora.
- Sarkar, A., Xu, F., & Lee, S. (2019). Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases – similarities and differences. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 273). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102034>
- Scarano, E., Picciotti, P., PaSSali, G., caStaGnola, M., & PaludEtti, G. (2010). Proteomics of saliva: personal experience Proteomica salivare: esperienza personale. In *Acta otorhinolaryngologica italica* (Vol. 30, pp. 125–130).
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, 52(12), 1114–1135. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>
- Sivadasan, P., Gupta, M. K., Sathe, G. J., Balakrishnan, L., Palit, P., Gowda, H., Suresh, A., Kuriakose, M. A., & Sirdeshmukh, R. (2015). Human salivary proteome - a resource of potential biomarkers for oral cancer. *Journal of Proteomics*, 127, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.039>
- Skvortsova, A., Veldhuijzen, D. S., Kloosterman, I. E. M., Pacheco-López, G., & Evers, A. W. M. (2021). Food anticipatory hormonal responses: A systematic review of animal and human studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 126, 447–464. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.030>
- Smeets, P. A. M., Erkner, A., & De Graaf, C. (2010). Cephalic phase responses and appetite. *Nutrition Reviews*, 68(11), 643–655. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00334.x>
- Spence, M., Livingstone, M. B. E., Hollywood, L. E., Gibney, E. R., O'Brien, S. A., Pourshahidi, L. K., & Dean, M. (2013). A qualitative study of psychological, social and behavioral barriers to appropriate food portion size control. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1479-5868-10-92>
- Trueba, A. F., Mizrachi, D., Auchus, R. J., Vogel, P. D., & Ritz, T. (2012). Effects of psychosocial stress on the pattern of salivary protein release. *Physiology and Behavior*, 105(3), 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.10.014>

- Tvarijonaviciute, A., Silvia Martínez-Subiela, S., López-Jornet, P., & Lamy, E. (Eds.). (2020). *Saliva and Health Disease*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9)
- Urbaniak, A., Jablonska, K., Podhorska-Okolow, M., Ugorski, M., & Dziegiel, P. (2018). Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression. *American journal of cancer research*, 8(11), 2150.
- van der Waal, N. E., Janssen, L., Antheunis, M., Culleton, E., & van der Laan, L. N. (2021). The appeal of virtual chocolate: A systematic comparison of psychological and physiological food cue responses to virtual and real food. *Food Quality and Preference*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104167>
- Van Dongen, M. V., Van Den Berg, M. C., Vink, N., Kok, F. J., & De Graaf, C. (2012). Taste-nutrient relationships in commonly consumed foods. *British Journal of Nutrition*, 108(1), 140–147. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005277>
- Varga, G. (2012). Physiology of the salivary glands. *Surgery (Oxford)*, 30(11), 578–583.
- Wadhera, D., & Capaldi-Phillips, E. D. (2014). A review of visual cues associated with food on food acceptance and consumption. *Eating behaviors*, 15(1), 132-143.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Windholz, G. (1986). A Comparative Analysis of the Conditional Reflex Discoveries of Pavlov and Twitmyer, and the Birth of a Paradigm. *The Pavlovian Journal of Biological Science*, 21(4), 141–147. <https://doi.org/10.1007/BF02734512>
- Yamashita, H., Iwai, M., Nishimura, K., Kobayashi, N., & Shimazu, T. (1993). Altered Lipid Metabolism during Enteral or Parenteral Nutrition in Rats Comparison with Oral Feeding. In *J. Nutr, Sci. Vitaminoio* (Vol. 39).
- Yrjänäinen, A., Patrikainen, M. S., Azizi, L., Tolvanen, M. E. E., Laitaoja, M., Jänis, J., Hytönen, V. P., Nocentini, A., Supuran, C. T., & Parkkila, S. (2022). Biochemical and Biophysical Characterization of Carbonic Anhydrase VI from Human Milk and Saliva. *Protein Journal*, 41(4–5), 489–503. <https://doi.org/10.1007/s10930-022-10070-9>

Zafra, M. A., Molina, F., & Puerto, A. (2006). The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(7), 1032–1044. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.005>

Zallocco, L., Giusti, L., Ronci, M., Mussini, A., Trerotola, M., Mazzoni, M. R., Lucacchini, A., & Sebastiani, L. (2021). Salivary proteome changes in response to acute psychological stress due to an oral exam simulation in university students: Effect of an olfactory stimulus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094295>

Anexos

Anexo 1 | Declaração de consentimento informado utilizado no estudo.



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

Declaração de consentimento informado

Efeito de estímulos alimentares visuais no proteoma salivar e percepção gustativa

Caro/a voluntário/a,

A equipa de investigação do laboratório de fisiologia animal aplicada da Universidade de Évora está a realizar um estudo sobre o "Efeito de estímulos alimentares visuais no proteoma salivar e percepção gustativa". A sua participação consiste na observação de imagens de alimentos diferentes com recurso a realidade virtual e consequente recolha de saliva, de forma estimulada e não estimulada, para posterior avaliação, em laboratório, da composição proteica. Também consistirá na resposta a um questionário onde será recolhida informação como a idade, peso, altura e principais hábitos alimentares e também numa breve entrevista, para avaliar as emoções, o nível de apetite/saciedade e a percepção gustativa. Para esta avaliação da percepção gustativa, ser-lhe-á pedido que coloque tiras de papel de filtro, previamente embebidas em soluções sápidas e que assinale a intensidade percebida numa escala. No decorrer do estudo será assegurado o devido respeito pelos cuidados éticos e deontológicos exigidos - o processo será mantido confidencial e os dados obtidos irão servir apenas para os efeitos desta investigação, não sendo tratados de forma individual, mas sim no seu conjunto. Os dados serão processados de forma estatística e posteriormente divulgados em evento e/ou revista científica. Desejamos muito que participe neste projeto.

Se necessitar o esclarecimento de alguma dúvida, ou mais informação relacionada com o projeto, pode contactar a investigadora responsável, Elsa Lamy – ecsl@uevora.pt

Desde já agradecemos a sua disponibilidade.

Autorização:

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

Data: ___ / ___ / _____

Assinatura: _____

Anexo 2 | Questionário acerca das reações desencadeadas pelas imagens.



Código participante _____

Alimento 1 *(Identificação do alimento observado)* _____

1. Em que medida sente apetite, após a visualização deste alimento?

Para o consumo de uma refeição completa

1 Nenhum apetite	2	3	4	5	6	7	8	9 Apetite extremo
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Para o consumo do alimento visualizado, em particular

1 Nenhum apetite	2	3	4	5	6	7	8	9 Apetite extremo
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

2. Em que medida a visualização do alimento a remeteu para as seguintes emoções

Desejo	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Água na boca	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bem-estar/calma	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fascínio/excitação	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ansiedade (por ex por ser um alimento que "não devo ingerir")	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alegria	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Nojo	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Apatia/indiferença	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Alimento 2_ *(Identificação do alimento observado)* _____

1. Em que medida sente apetite, após a visualização deste alimento?

Para o consumo de uma refeição completa

1 Nenhum apetite	2	3	4	5	6	7	8	9 Apetite extremo
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Para o consumo do alimento visualizado, em particular

1 Nenhum apetite	2	3	4	5	6	7	8	9 Apetite extremo
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

2. Em que medida a visualização do alimento a remeteu para as seguintes emoções

Desejo	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Água na boca	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
-	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bem-estar/calma	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fascínio/excitação	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ansiedade (por ex por ser um alimento que "não devo ingerir")	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alegria	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Nojo	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Apatia/indiferença	1 Nada	2	3	4	5	6	7	8	9 Extremamente
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

iogurte natural																			
Framboesas, groselhas																			
Gomas ácidas																			
Batatas fritas																			
Molho de soja																			
Frutos secos salgados (e.g., amendoim)																			
Bacalhau																			
Bolachas de água e sal																			
Café																			
Chá verde/preto																			
Cacau																			
Brócolos																			
Couves-de-bruxelas																			

Anexo 4 | Tabela 16.

Tabela 16: Alterações no perfil proteico induzidas pelas diferentes imagens (alimentares + controlo) considerando o “desejo de ingerir” como covariável.

Bandas proteicas	P	
	Período	Interação período*covariável
-a	0,683	0,668
a	0,205	0,173
a1	0,890	0,628
b1	0,203	0,380
b	0,604	0,979
c1	0,171	0,165
c	0,002*	0,013*
d	0,002*	0,029*
e	0,237	0,247
e1	0,880	0,961
e2	0,623	0,449
e3	0,448	0,998
e4	0,261	0,326
e5	0,404	0,581
f	0,764	0,505
g	0,066	0,028*
-h	0,402	0,419
h	0,039*	0,027*
h1	0,169	0,201
h2	0,798	0,939
i1	0,163	0,167
i2	0,587	0,274
j	0,628	0,896

Nota: * significativo para um valor de $P < 0,05$.