



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

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Efeito do exercício físico na perceção gustativa e na  
composição da saliva**

**Ana Cecília Bonito Roque**

Orientador(es) | Elsa Cristina Lamy  
Armando Manuel Raimundo  
Nuno Miguel Prazeres Batalha

Évora 2023





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

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Efeito do exercício físico na perceção gustativa e na  
composição da saliva**

Ana Cecília Bonito Roque

Orientador(es) | Elsa Cristina Lamy  
Armando Manuel Raimundo  
Nuno Miguel Prazeres Batalha

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 | Elsa Cristina Lamy (Universidade de Évora) (Orientador)  
María Jiménez (Universidade de Évora) (Arguente)

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, aos meus orientadores, Dr<sup>a</sup>. Elsa Lamy, Dr. Nuno Batalha e Dr. Armando Raimundo pela oportunidade de realizar esta dissertação e por toda a ajuda prestada. Queria expressar o meu especial agradecimento à Dr<sup>a</sup>. Elsa pelos ensinamentos, enorme simpatia, paciência, compreensão e dedicação ao longo de todo o trabalho. Sem a sua ajuda, este trabalho não seria possível!

Do mesmo modo, queria agradecer às minhas colegas de laboratório, Carla, Inês e Laura, pela ajuda, pelos ensinamentos na execução das técnicas no laboratório, pelos conselhos dados e pela partilha de bons momentos. À minha colega e amiga, Érica, pela partilha de momentos mais complicados, em que nada parecia correr de feição e de outros bons momentos de convívio e amizade.

Queria também agradecer a todos os técnicos e funcionários da Mitra, Pavilhão Gimnodesportivo e Verney, com quem convivi e que ajudaram na realização deste trabalho.

E, por último, mas não menos importante, agradeço à minha família! À minha mãe e ao meu pai, por toda a ajuda, apoio e compreensão no decorrer deste percurso e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, muito obrigada por tudo! Ao meu irmão, pelos momentos de animação e distrações quando o trabalho se complicava. Ao meu namorado, Pedro, agradeço toda a paciência, ajuda e carinho ao longo desta jornada. Obrigada por não me deixares desanimar! Agradeço ainda aos meus avós, que apesar de já não estarem presentes, sei que ficariam muito orgulhosos.

Muito obrigada a todos!

Ana Roque  
Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

## Índice

Agradecimentos .....	i
Índice de figuras .....	v
Índice de tabelas .....	vi
Abreviaturas e convenções .....	vii
Unidades .....	x
Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1. Exercício físico e os seus benefícios.....	2
1.2. Percepção gustativa e saliva.....	4
1.2.1. Anatomofisiologia da percepção gustativa.....	4
1.2.2. Relação da percepção gustativa com a saliva.....	8
1.3. Saliva .....	10
1.3.1. Anatomia e fisiologia das glândulas salivares.....	10
1.3.2. Composição .....	13
1.3.3. Função .....	15
1.4. Relação do exercício físico com a percepção gustativa e com a saliva .....	17
1.4.1. Relação do exercício físico com a percepção gustativa .....	17
1.4.2. Relação do exercício físico com a composição da saliva.....	18
Capítulo II – Problemática e Objetivos .....	22
2.1. Problemática .....	23
2.2. Objetivo geral .....	23
2.3. Objetivos específicos .....	24
Capítulo III – Metodologia.....	25
3.1. Aspectos éticos .....	26
3.2. Participantes.....	26
3.3. Desenho experimental.....	27
3.4. Ensaio experimental.....	28
3.5. Avaliação da taxa de secreção salivar.....	30
3.6. Análises laboratoriais das amostras de saliva.....	31

3.6.1.	Doseamento de proteína total – Método de Bradford.....	31
3.6.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 33	
3.6.3.	Determinação da atividade enzimática da $\alpha$ -amílase.....	35
3.6.4.	Eletroforese bidimensional .....	36
3.7.	Análise estatística .....	40
Capítulo IV – Resultados.....		41
4.1.	Efeito do exercício na sensibilidade gustativa.....	42
4.2.	Efeito do exercício na salivação e perfil proteico da saliva.....	44
4.3.	Efeito do exercício na atividade enzimática da amílase .....	45
4.4.	Efeito do exercício no perfil proteico salivar.....	45
4.5.	Relação entre parâmetros salivares e sensibilidade gustativa.....	52
4.6.	Resultados da eletroforese bidimensional.....	52
Capítulo V – Discussão de resultados .....		57
Capítulo VI – Conclusão .....		67
Referências bibliográficas .....		70
Anexos.....		82

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Células recetoras do gosto (TRC), gomos gustativos e papilas na língua (Chandrashekar <i>et al.</i> , 2006).....	5
Figura 1.2 - Capacidade de reconhecimento dos 5 gostos básicos pela língua (Chandrashekar <i>et al.</i> , 2006).....	7
Figura 1.3 - Localização das glândulas salivares maiores: Glândula parótida, glândula submandibular, glândula sublingual (Granger & Taylor, 2020). ....	11
Figura 1.4 - Ductos do tecido glandular salivar (Tvarijonaviciute <i>et al.</i> , 2020). ....	12
Figura 3.1 - Curva padrão de BSA para a determinação da concentração proteica. ....	33
Figura 4.1 - Variação da intensidade percebida de doce, com o exercício, para indivíduos desportistas (esquerda) e sedentários (direita).....	43
Figura 4.2 - Variação da intensidade percebida de amargo em função do tipo de exercício (alta intensidade ou intensidade moderada).....	44
Figura 4.3 - Gel representativo do perfil proteico salivar obtido para as amostras analisadas. As lanes com os números de 1-3 e 5-10 representam diferentes amostras (com os respetivos códigos no topo da lane) e a lane 4 representa o padrão de massas moleculares utilizado. As letras de A a P representam as diferentes bandas proteicas presentes na maioria dos perfis.....	46
Figura 4.4 - Imagem representativa do perfil 2DE obtido para as amostras de saliva. Os números representam os spots proteicos emparelhados e considerados para análise.....	53
Figura 4.5 - Spots proteicos aumentados apenas pelo exercício de alta intensidade.....	54
Figura 4.6 - Spots proteicos diminuídos apenas pelo exercício de alta intensidade.....	55

## Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Preparação das soluções de BSA para a curva padrão .....	32
Tabela 3.2 - Volumes para a preparação das diluições das amostras .....	32
Tabela 3.3 - Características da focagem isoeletrica .....	38
Tabela 4.1 - Caracterização da amostra (média $\pm$ desvio padrão).....	42
Tabela 4.2 - Efeito do exercício na taxa de secreção salivar e concentração proteica da saliva.....	44
Tabela 4.3 - Atividade enzimática da amilase salivar (U/mL), antes e depois da prática de exercício.....	45
Tabela 4.4 - Identificações de proteínas potencialmente constituintes das bandas proteicas analisadas (baseado em resultados obtidos previamente para saliva humana (Carreira <i>et al.</i> , 2020)) .....	46
Tabela 4.5 - Bandas proteicas que sofrem variações induzidas pelo exercício físico ....	50
Tabela 4.6 - Variações no perfil salivar 2DE com o exercício.....	53
Tabela 4.7 - Identificações dos spots proteicos em que se observou efeito do exercício (com base em identificações apresentadas noutros estudos).....	56

## Abreviaturas e convenções

<b>Δ</b>	Variação
<b>2DE</b>	Eletroforese bidimensional (do inglês “ <i>two-dimensional gel electrophoresis</i> ”)
<b>Abs</b>	Absorvência
<b>APS</b>	Persulfato de amónio (do inglês “ <i>ammonium persulfate</i> ”)
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino (do inglês “ <i>bovine serum albumin</i> ”)
<b>CA VI</b>	Anidrase carbónica VI (do inglês “ <i>carbonic anhydrase VI</i> ”)
<b>CHAPS</b>	Propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (do inglês “ <i>3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate</i> ”)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol (do inglês “ <i>dithiothreitol</i> ”)
<b>Ex</b>	Exemplo
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FCM</b>	Frequência cardíaca máxima
<b>GLM</b>	Modelo linear generalizado (do inglês “ <i>general linear model</i> ”)
<b>HIIT</b>	Treino intervalado de alta intensidade (do inglês “ <i>High-Intensity Interval Training</i> ”)
<b>HPA</b>	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>Ig</b>	Imunoglobulina (do inglês “ <i>immunoglobulin</i> ”)
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IPG</b>	Gradiente de pH imobilizado (do inglês “ <i>immobilized pH gradient</i> ”)
<b>IPG buffer</b>	Mistura de anfólitos
<b>LMS</b>	Escala de magnitude rotulada (do inglês “ <i>Labeled Magnitude Scale</i> ”)

<b>MICT</b>	Treino contínuo de intensidade moderada (do inglês “ <i>Moderate-Intensity Continuous Training</i> ”)
<b>MUC</b>	Mucinas
<b>MW</b>	Massa molecular (do inglês “ <i>molecular weight</i> ”)
<b>n.i.</b>	Não identificada
<b>OD</b>	Densidade óptica (do inglês “ <i>optical density</i> ”)
<b>PG</b>	Glândulas parótidas (do inglês “ <i>parotid glands</i> ”)
<b>pH</b>	Ponto de hidrogénio iónico
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PIP</b>	Proteína induzida pela prolactina
<b>PROP</b>	6-n-propiltiouracil (do inglês “ <i>6-n-propylthiouracil</i> ”)
<b>PRP</b>	Proteínas ricas em prolina (do inglês “ <i>proline-rich proteins</i> ”)
<b>QFA</b>	Questionário de frequência alimentar
<b>RPE</b>	Escala de esforço percebido (do inglês “ <i>Rating of Perceived Exertion</i> ”)
<b>sAA</b>	Alfa-amilase salivar (do inglês “ <i>salivary alpha-amylase</i> ”)
<b>SAM</b>	Eixo simpático-adreno-medular
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”)
<b>SDS-PAGE</b>	Eletoforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> ”)
<b>sIgA</b>	Imunoglobulina A secretora (do inglês “ <i>secretory immunoglobulin A</i> ”)
<b>SLG</b>	Glândulas sublinguais (do inglês “ <i>sublingual glands</i> ”)
<b>SMG</b>	Glândulas submandibulares (do inglês “ <i>submandibular glands</i> ”)
<b>TEMED</b>	Tetrametiletenodiamina (do inglês “ <i>tetramethylethylenediamine</i> ”)
<b>TRCs</b>	Células recetoras do gosto (do inglês “ <i>taste receptor cells</i> ”)

**VO<sub>2</sub> máx** | Volume de oxigénio máximo

## Unidades

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>kDa</b>	Quilo-Dalton
<b><i>g</i></b>	Força centrífuga
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>µg</b>	Micrograma
<b>g</b>	Gramma
<b>kg</b>	Quilograma
<b>h</b>	Hora
<b>min</b>	Minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b>m<sup>3</sup></b>	Metro cúbico
<b>(<i>m/v</i>)</b>	(massa/volume)
<b>(<i>v/v</i>)</b>	(volume/volume)
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>V</b>	Volts

## **Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva**

### **Resumo**

A prática de atividade física pode provocar alterações no meio oral, nomeadamente, a nível da salivação, as quais, por sua vez, podem associar-se a alterações na percepção dos alimentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar quais são as alterações induzidas por diferentes tipos de atividade física na percepção gustativa e na composição bioquímica da saliva em indivíduos com prática regular de exercício e sedentários. Para isso, os participantes foram divididos em dois grupos distintos, desportistas e sedentários, sendo os grupos balanceados na sua constituição em homens e mulheres jovens. Os participantes foram sujeitos a dois tipos de treino: i) treino intervalado de alta intensidade; ii) treino contínuo de intensidade moderada. Antes e após cada treino foi avaliada a intensidade percebida de doce e amargo e foi feita uma recolha de saliva. Analisou-se a taxa de secreção salivar, concentração proteica, atividade enzimática da  $\alpha$ -amílase salivar e estudaram-se as alterações no proteoma salivar através de eletroforese unidimensional e bidimensional. Observou-se um aumento significativo na sensibilidade ao gosto doce após a prática de exercício físico. Apesar da taxa de secreção salivar não se ter alterado significativamente, a concentração proteica aumentou com a prática de exercício. A forma nativa da  $\alpha$ -amílase sofreu aumentos com o exercício, ainda que de forma diferente de acordo com a intensidade do exercício e a prática habitual dos indivíduos. No que diz respeito a outras proteínas, as variações também dependeram do tipo de exercício/prática habitual. Por exemplo, os níveis de CA VI diminuíram com o exercício, apenas nos indivíduos desportistas, tendo-se observado relação entre esta proteína e a sensibilidade gustativa, nomeadamente, diminuições nos níveis de CA VI que se associaram a aumentos na sensibilidade para o doce, no caso das mulheres. Conclui-se que a prática de atividade física afeta a salivação e a sensibilidade gustativa, mas que os efeitos devem ter em conta a intensidade do mesmo, assim como o sexo e os hábitos de prática de atividade física dos indivíduos.

**Palavras-chave:** exercício físico; percepção gustativa; proteoma salivar; desportistas; sedentários

Ana Roque  
Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

## **Effect of physical exercise on taste perception and saliva composition**

### **Abstract**

Physical activity can cause changes in the oral environment, particularly, in salivation, which in turn can be associated with changes in food perception. This work aimed to evaluate which are the alterations induced by physical exercise in the gustatory perception and in the biochemical composition of saliva in individuals with regular practice of exercise and sedentary ones. For this purpose, the participants were divided into two distinct groups, sportsmen and sedentary, with the groups being balanced in their constitution in young men and women. Participants were subjected to two types of training: i) high-intensity interval training; ii) moderate-intensity continuous training. Before and after each training, the perceived intensity of sweet and bitter was evaluated and saliva was collected. Salivary secretion rate, protein concentration, enzymatic activity of salivary  $\alpha$ -amylase were analyzed and alterations in the salivary proteome were studied through unidimensional and bidimensional electrophoresis. There was a significant increase in sensitivity to sweet taste after physical exercise. Although salivary secretion rate did not change significantly, protein concentration increased with exercise. The native form of  $\alpha$ -amylase increased with exercise, although differently according to exercise intensity and habitual practice. For other proteins, variations also depended on the type of exercise/habitual practice. For example, CA VI levels decreased with exercise, only in sportsmen, and a relationship was observed between this protein and taste sensitivity, namely, decreases in CA VI levels were associated with increases in sweet sensitivity in women. It is concluded that physical activity affects salivation and taste sensitivity, but that the effects should take into account the intensity of the activity, as well as the gender and physical activity habits of the individuals.

**Key-words:** physical exercise; taste perception; salivary proteome; sportsmen; sedentary



## Capítulo I – Introdução

# 1. Introdução

## 1.1. Exercício físico e os seus benefícios

A prática regular de exercício físico está associada a diversos benefícios para a saúde, incluindo uma ação protetora contra doenças metabólicas, como a obesidade, diabetes e hipertensão (Ventura *et al.*, 2022). Também resulta noutros efeitos benéficos, incluindo a diminuição do colesterol alto e manutenção de massa muscular, ossos e articulações saudáveis. Além disso, pode reduzir o peso e/ou gordura corporal, ajudando na diminuição da massa gorda e da circunferência da cintura, aumentando ainda a massa magra (sem gordura). Outros benefícios para a saúde incluem uma diminuição da frequência cardíaca em repouso e da pressão arterial (sistólica e diastólica), um aumento da aptidão cardiovascular e do humor (Blundell, 2011; Finkler *et al.*, 2014).

A relação entre o exercício físico e o controlo do apetite tem vindo a ser alvo de um interesse crescente já que ambos desempenham um papel importante no balanço energético. A atividade física regular está associada a várias adaptações fisiológicas, como a melhoria da sensibilidade à insulina, sensibilidade à leptina, pressão arterial, lípidos no sangue e composição corporal, sendo que, alguns dos quais foram propostos como mecanismos envolvidos no comportamento alimentar (Beaulieu *et al.*, 2016).

A atividade física pode influenciar o peso corporal, levando a que as pessoas passem de uma zona sedentária “não regulada” para uma zona fisiologicamente “regulada”, onde o gasto energético e a ingestão de energia estão mais equilibrados. Nesta zona regulada, o exercício físico melhora a sensibilidade do controlo do apetite, impulsionando a ingestão de energia (através de um aumento na taxa metabólica de repouso e no gasto de energia) e, simultaneamente, aumenta as sensações pós-prandiais de saciedade (Beaulieu *et al.*, 2017; Blundell, 2011).

Para adultos praticantes de exercícios cardiovasculares, a recomendação padrão é de 30 a 60 minutos de exercício de intensidade moderada 5 dias por semana, ou 20 a 60 minutos de exercício de intensidade vigorosa 3 dias por semana, ou uma combinação desses regimes de intensidade moderada e vigorosa 3 a 5 dias por semana (Gottschall *et al.*, 2020). Os métodos tradicionais de treino de resistência, em especial para controlo do peso, tendem a concentrar-se em sessões de longa duração envolvendo exercícios de intensidade moderada realizados continuamente sem descanso, geralmente chamados de treino contínuo de intensidade moderada (MICT). Nos últimos anos, o treino intervalado de alta intensidade (HIIT), que se refere a uma alternância de curtos momentos de exercícios de alta intensidade e períodos de recuperação, tornou-se uma alternativa popular devido à sua eficiência de tempo, uma vez que a falta de tempo é uma barreira frequentemente referida para a prática de exercício (Wewege *et al.*, 2017).

O treino intervalado de alta intensidade (HIIT) é um tipo de exercício que alterna curtos períodos (< 60 s até 8 min) de atividade aeróbica de alta intensidade com recuperação ativa ou passiva com períodos de recuperação de 1-5 min (Wood *et al.*, 2019). O HIIT conta com períodos de atividade aeróbica com uma intensidade  $\geq 85\%$  da frequência cardíaca máxima (FCM) (ou um índice fisiológico substituto, ou seja, 80% da capacidade aeróbica máxima (volume de oxigénio máximo (VO<sub>2</sub> máx)) ou uma avaliação de esforço percebido (RPE) de 17 na escala de Borg) (Wewege *et al.*, 2017). Os períodos de recuperação podem ser de recuperação ativa com uma intensidade de 40-70% da FCM (ou uma RPE de 8-13 na escala de Borg) ou passiva (com cessação de movimento) (Wood *et al.*, 2019).

O treino contínuo de intensidade moderada (MICT) é um tipo de exercício que inclui exercícios aeróbicos contínuos com uma intensidade de 60-75% da FCM (ou 50-65% do VO<sub>2</sub> máx, 12-15 na RPE (Wewege *et al.*, 2017) ou 11-13 na RPE (Wood *et al.*, 2019)). Recentemente, existem evidências de que o HIIT pode demonstrar resultados superiores em comparação com o MICT, nomeadamente, na composição corporal, promovendo a perda de peso e na aptidão cardiorrespiratória, promovendo um maior aumento no volume de oxigénio máximo (Gottschall *et al.*, 2020; Viana *et al.*, 2019; Wewege *et al.*, 2017).

De acordo com a literatura, a avaliação da intensidade de um exercício pode ser estimada tendo em conta a FCM (Gottschall *et al.*, 2020; Roy *et al.*, 2018; Viana *et al.*, 2019; Wewege *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2019), a capacidade aeróbica máxima (VO<sub>2</sub> máx) (Viana *et al.*, 2019) e a escala de esforço percebido (RPE) de Borg (Roy *et al.*, 2018; Wewege *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2019). A FCM é estimada de acordo com a idade utilizando a seguinte fórmula (220 – idade) (Roy *et al.*, 2018). A capacidade aeróbica máxima é normalmente relatada como VO<sub>2</sub> máx, sendo este o consumo máximo de oxigénio que pode ser alcançado durante um exercício de intensidade máxima. O VO<sub>2</sub> máx pode ser estimado por meio de testes como caminhada/corrída, ciclismo e testes de degrau (Buttar *et al.*, 2019). A escala de esforço percebido (RPE) de Borg é uma ferramenta usada para medir o esforço, falta de ar e fadiga de um indivíduo durante o trabalho físico e, portanto, é altamente relevante para a prática de saúde e segurança (Williams, 2017).

## **1.2. Percepção gustativa e saliva**

### **1.2.1. Anatomofisiologia da percepção gustativa**

A percepção gustativa/percepção do gosto é a sensação experimentada quando uma substância é reconhecida pelos recetores gustativos, presentes na cavidade oral, em particular, nas papilas gustativas que se situam na língua (Breslin, 2013; Jayasinghe *et al.*, 2017; Low *et al.*, 2016). Esta sensação só pode ocorrer pela interação das moléculas presentes nos alimentos com os recetores gustativos, pelo que a presença de saliva na cavidade oral é essencial para providenciar o fluido no qual essas moléculas (*tastants*) se podem dissolver, distribuindo o gosto pela cavidade oral até aos gomos gustativos (Dawes *et al.*, 2015; Pedersen *et al.*, 2002; Tvarijonavičiute *et al.*, 2020).

Os substratos anatômicos e unidades de detecção do gosto são as células recetoras do gosto (TRCs). As TRCs (Figura 1.1) estão presentes nos gomos gustativos, estando estes localizados nas diferentes papilas gustativas que são distribuídas pelo epitélio da língua e do palato (Chandrashekar *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2020; Tvarijonavičiute *et al.*, 2020). As TRCs projetam microvilosidades para a superfície apical do gomo gustativo, onde formam um pequeno orifício epitelial chamado poro gustativo, sendo este o local de interação com as substâncias do gosto (*tastants*) (Breslin, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2013).

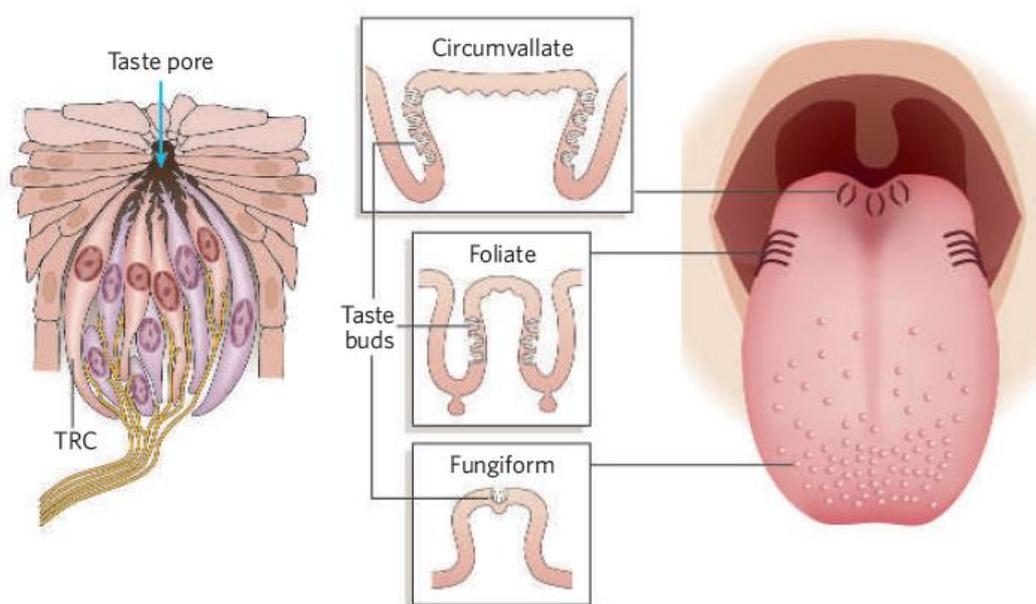


Figura 1.1 - Células recetoras do gosto (TRC), gomos gustativos e papilas na língua (Chandrashekar *et al.*, 2006).

Entre os diferentes tipos de papilas (Figura 1.1), as papilas fungiformes são encontradas nos 2/3 anteriores da língua, as papilas foliadas estão presentes na borda lateral posterior da língua e as papilas circunvaladas localizam-se mesmo no fundo da língua (Breslin, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2013; Tvarijonavičiute *et al.*, 2020).

Existe ainda um quarto tipo de papilas que são umas pequenas estruturas que normalmente envolvem as papilas fungiformes e são denominadas de papilas filiformes. Estas papilas não contêm gomos gustativos, ou seja, não são responsáveis pela percepção dos gostos, servindo para tornar a superfície da língua mais áspera, ajudando a detetar

texturas de alimentos, fazendo a transdução do toque, temperatura e nocicepção (Breslin, 2013; Gravina *et al.*, 2013).

Embora possam existir variações extremas, os seres humanos têm normalmente entre 5000 e 10000 gomos gustativos (Loper *et al.*, 2015), sendo que, cada um deles pode ser constituído por 50 a 100 TRCs (Soares *et al.*, 2020). Os gomos gustativos estão presentes na língua em 3 áreas principais (Figura 1.1), associados às papilas fungiformes, foliadas e circunvaladas, mais concretamente, no cimo das papilas fungiformes e nas fendas das papilas foliadas e circunvaladas (Carpenter, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Dawes *et al.*, 2015). Relativamente ao número de gomos gustativos que constituem cada tipo de papila, as papilas fungiformes abrigam desde 0 a 15 gomos gustativos, as foliadas contêm mais de 100 gomos gustativos e as papilas circunvaladas apresentam também mais de 100 gomos gustativos, podendo chegar aos milhares (Breslin, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2013).

O sentido do gosto pode ser classificado como um sistema de deteção nutriente-toxina, permitindo avaliar o conteúdo nutritivo da comida, assegurando que consumimos os nutrientes essenciais para a nossa sobrevivência e funcionamento e prevenindo a ingestão de substâncias potencialmente tóxicas ou nocivas (Breslin, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Keast & Costanzo, 2015; Low *et al.*, 2016; Pedersen *et al.*, 2002).

A nível oral existe uma grande variação individual. As pessoas podem diferir no modo como os alimentos são manipulados na boca, na biologia dos seus recetores sensoriais e na sua composição salivar, sendo expectável que o mesmo alimento possa resultar em diferentes relatos de percepção e até aceitação alimentar (Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

Existem 5 gostos básicos reconhecidos: doce, salgado, ácido, amargo e umami (Breslin, 2013; Dawes *et al.*, 2015; Gravina *et al.*, 2013; Jayasinghe *et al.*, 2017; Loper *et al.*, 2015). Os glúcidos são experienciados como doce, os sais de sódio e de outros catiões são experienciados como salgado, os aminoácidos glutamato, aspartato e ácidos ribonucleicos selecionados são experienciados como umami, os ácidos são experienciados como ácido e muitos compostos tóxicos são experienciados como amargo (Breslin, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006; Keast & Costanzo, 2015; Loper *et al.*, 2015). Estas sensações gustativas influenciam o consumo de comida (doce, salgado, umami) e

podem despoletar uma rejeição de toxinas (amargo, ácido), então, a percepção gustativa influencia a escolha alimentar e ingestão dietética (Chandrashekar *et al.*, 2006; Jayasinghe *et al.*, 2017).

A hip tonicidade da saliva não estimulada é muito vantajosa relativamente ao gosto. Os gomos gustativos adaptam-se rapidamente ao gosto de qualquer solução na boca, uma vez que a saliva contém glucose (doce), bicarbonato (que tampona as soluções ácidas) e ureia (principal substância amarga na saliva), mas todos em baixas concentrações, abaixo do limiar de reconhecimento do gosto, facilitando a sensação do gosto (Dawes *et al.*, 2015).

O mapa gustativo da língua que era frequentemente apresentado na literatura está a ser amplamente discutido e, ao contrário da crença popular, em que se pensava que só determinadas regiões da língua eram capazes de detetar gostos específicos, não existe um mapa definido (Figura 1.2), ou seja, a maior parte da área da língua consegue detetar a maioria dos gostos (doce, salgado, amargo, ácido e umami) (Breslin, 2013; Carpenter, 2013; Chandrashekar *et al.*, 2006).

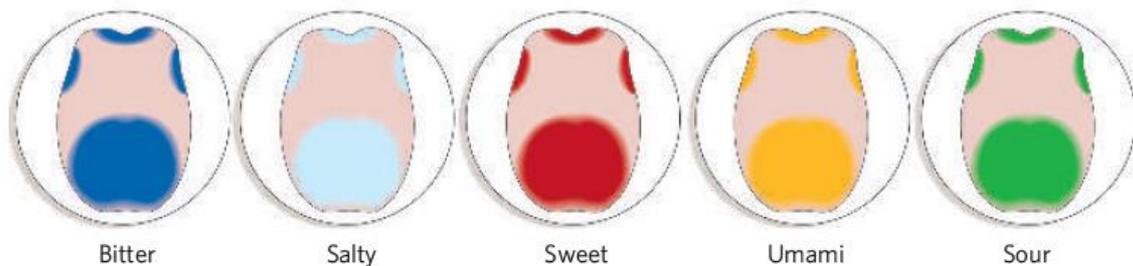


Figura 1.2 - Capacidade de reconhecimento dos 5 gostos básicos pela língua (Chandrashekar *et al.*, 2006).

Cada tipo de gosto é baseado em sistemas transduccionais distintos nas células recetoras gustativas, levando à despolarização do potencial do recetor e à geração de potenciais de ação. Isto facilita a libertação de neurotransmissores, estimulando as fibras nervosas aferentes gustativas que então transportam o sinal gustativo para os sistemas de ordem superior, ou seja, para as regiões de processamento do cérebro. Posteriormente, estes sinais são descodificados pelo cérebro, percebendo-se o gosto dos alimentos como doce, salgado, ácido, amargo ou umami (Keast & Costanzo, 2015; Pedersen *et al.*, 2002).

No presente trabalho foram avaliados os gostos doce e amargo, sendo que, para o gosto doce existem 2 recetores principais que traduzem este estímulo, nomeadamente, o T1R2 e o T1R3. Para o gosto amargo existem 25 tipos de recetores, os quais pertencem à família de recetores T2Rs (Breslin, 2013; Dawes *et al.*, 2015).

### **1.2.2. Relação da percepção gustativa com a saliva**

Nos últimos anos, têm havido evidências crescentes de que a composição da saliva está relacionada à forma como o alimento é percebido na cavidade oral, podendo influenciar a aceitação e preferências alimentares (Carreira *et al.*, 2020; Lamy *et al.*, 2018; Morzel *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017). A sensibilidade gustativa está relacionada com a composição salivar uma vez que a parte superior de cada célula recetora gustativa está banhada pelos fluidos orais (Pedersen *et al.*, 2002), sendo que, existem algumas proteínas salivares específicas com um papel importante na deteção do gosto (Martin *et al.*, 2019b). Os constituintes salivares, como péptidos e proteínas podem modular os recetores gustativos e canais iónicos, alterando a sensibilidade ao gosto ou podem interagir com o estímulo gustativo, afetando a sua concentração disponível para ativação do recetor gustativo (Stolle *et al.*, 2017).

O perfil proteico salivar está correlacionado com a sensibilidade à gordura e ao gosto salgado (Stolle *et al.*, 2017), ao gosto amargo (Cabras *et al.*, 2012; Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014) e ao gosto doce (Rodrigues *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019).

Ainda que não se tratando de um gosto básico, uma das sensações mais estudada, no que diz respeito à participação direta da saliva, é a adstringência. Durante o consumo de alimentos, os polifenóis contidos nos mesmos, mais em particular, os taninos, interagem com as proteínas salivares, especialmente as proteínas ricas em prolina (PRPs), formando agregados insolúveis que são responsáveis pela origem da sensação de adstringência (Lamy *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2018). As PRPs e também as histatinas básicas precipitam após a complexação de polifenóis adstringentes, sendo que, baixos níveis destas proteínas podem estar correlacionados a um aumento da

percepção de adstringência. Ou seja, observou-se que os indivíduos que são capazes de restaurar rapidamente os seus conteúdos iniciais destas proteínas demonstraram ser menos sensíveis à adstringência (Stolle *et al.*, 2017). Este envolvimento destas proteínas na adstringência é ainda reforçado por estudos que mostram que as PRPs estão relacionadas com um aumento na aceitação de ácido tânico (Martin *et al.*, 2019a).

Para além da adstringência, as proteínas salivares também parecem ter efeito na sensibilidade para gostos básicos. A variação na sensibilidade gustativa entre indivíduos é influenciada por fatores genéticos, nomeadamente, polimorfismos em genes que codificam os recetores de amargo e doce ou por proteínas envolvidas na manutenção das células gustativas, como a gustina (anidrase carbónica VI (CA VI)) (Barbarossa *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019). Alguns estudos recentes evidenciaram que o fenótipo de degustação do composto amargo 6-n-propiltiouracil (PROP) envolve genes que codificam proteínas salivares como a CA VI e possivelmente algumas PRPs básicas (Morzel *et al.*, 2014). A capacidade de resposta ao PROP está fortemente associada com a funcionalidade da proteína salivar gustina (Cabras *et al.*, 2012), sendo que, uma diminuição nos níveis de CA VI está associada a uma diminuição geral da percepção gustativa (Dsamou *et al.*, 2012).

A atividade da amilase está correlacionada às alterações da percepção de alimentos ricos em amido. A amilase presente na saliva é capaz de hidrolisar as ligações da amilose e da amilopectina e demonstrou-se que a amilase em níveis encontrados na boca pode reduzir substancialmente a viscosidade do amido (Ferry *et al.*, 2006). A alfa-amilase salivar está inversamente relacionada à percepção do gosto doce, sendo que, foram encontrados elevados níveis desta proteína em indivíduos que apresentaram uma baixa sensibilidade ao doce (Rodrigues *et al.*, 2017).

Recentemente, reforçou-se a associação entre a saliva e a sensibilidade gustativa e a influência de fatores como o sexo nessa associação, já que foi demonstrado que crianças do sexo feminino com peso normal e altos níveis de leptina salivar apresentaram menor sensibilidade ao gosto doce (Rodrigues *et al.*, 2019).

Tendo em conta a relevância da saliva na percepção gustativa e as características particulares deste fluido, mais detalhe relativamente a aspetos anatomo-fisiológicos são apresentados no ponto 1.3.

### **1.3. Saliva**

#### **1.3.1. Anatomia e fisiologia das glândulas salivares**

As glândulas salivares fazem parte do trato digestivo e a sua principal função é secretar saliva para a cavidade oral, sendo essencial para a lubrificação, digestão, imunidade e manutenção geral da homeostase corporal (Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

As glândulas salivares são classificadas como glândulas salivares maiores e menores. Os termos “maiores” e “menores” dizem respeito ao tamanho anatómico das glândulas e ao volume de saliva produzida (Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

As glândulas salivares maiores (Figura 1.3), que existem como pares bilaterais, incluem 3 pares de glândulas: as glândulas parótidas (PG), que se localizam em frente aos primeiros molares superiores; as glândulas submandibulares (SMG), que se localizam debaixo da mandíbula e as sublinguais (SLG), que se encontram na parte inferior da boca, debaixo da língua. As glândulas salivares menores estão distribuídas em grupos de centenas na mucosa do trato digestivo superior, como por exemplo, o lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (Carpenter, 2013; Granger & Taylor, 2020; Holmberg & Hoffman, 2014; Humphrey & Williamson, 2001; Proctor & Carpenter, 2014; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

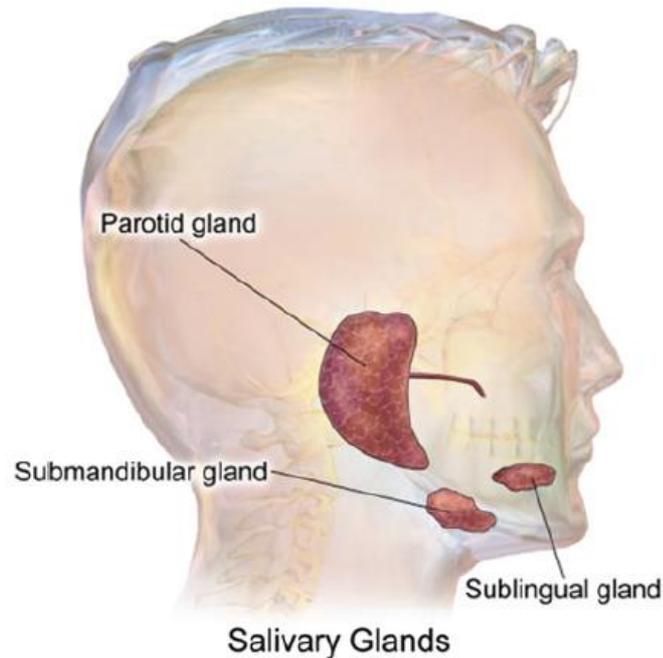


Figura 1.3 - Localização das glândulas salivares maiores: Glândula parótida, glândula submandibular, glândula sublingual (Granger & Taylor, 2020).

As glândulas salivares são exócrinas, sendo que, com base no tipo de secreções que as glândulas libertam, estas podem ser categorizadas em 3 tipos: (1) glândulas serosas, que produzem um líquido aquoso, que geralmente contém enzimas; (2) glândulas mucosas, que produzem mucinas, que se combinam com a água para formar muco; e (3) glândulas seromucosas (mistas) que produzem secreções serosas e mucosas (Granger & Taylor, 2020).

Estas glândulas produzem e secretam substâncias através de um ducto numa superfície epitelial, como a pele ou a cavidade oral. As glândulas salivares são compostas por diferentes tipos de células: células acinares/alveolares, células do sistema ductal e células mioepiteliais. As células acinares formam aglomerados chamados ácidos, que atuam como a unidade secretora da glândula (Granger & Taylor, 2020; Tvarijonavičiute *et al.*, 2020). O sistema ductal (Figura 1.4) é formado pelos ductos intercalados e ductos estriados que modificam o fluido salivar e pelos ductos excretores que coletam a saliva e a transportam para a boca, auxiliados pelas células mioepiteliais (Holmberg & Hoffman, 2014; Roblegg *et al.*, 2019).

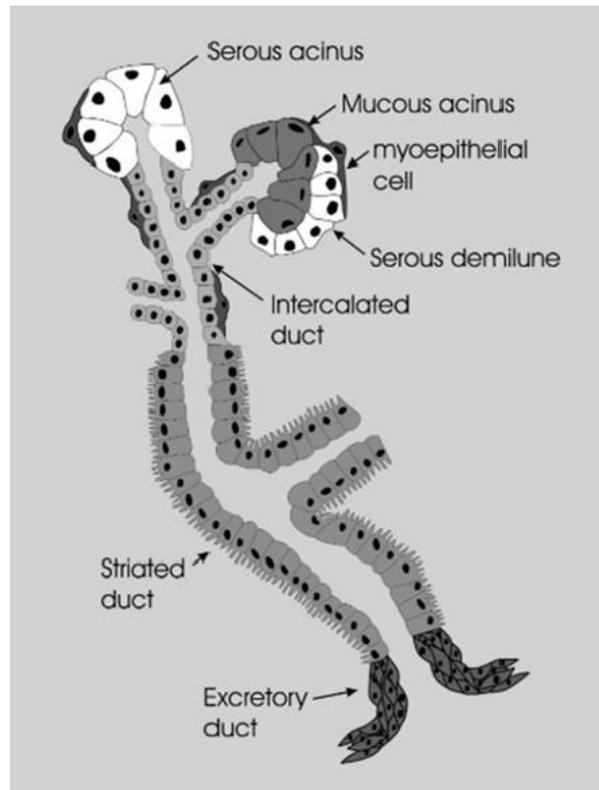


Figura 1.4 - Ductos do tecido glandular salivar (Tvarijonavičiute et al., 2020).

A saliva é primeiramente secretada pelos ácinos e, assim, o tipo de célula acinar da glândula dita o tipo de secreção a ser produzida (por exemplo, secreção serosa, mucosa ou mista) (Granger & Taylor, 2020).

A secreção de saliva é um mecanismo que envolve a secreção ativa de sal (íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ )) pelas células acinares no lúmen ductal ao receber um sinal neural do cérebro. A água derivada do sistema sanguíneo passa pelas junções oclusivas e, através dos canais de aquaporina, vai para as células acinares para formar fluido salivar isotônico em relação ao soro sanguíneo. Os ductos, impermeáveis à água, modificam o fluido removendo  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e adicionando potássio ( $\text{K}^+$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Assim, o fluido isotônico primário transforma-se em saliva hipotônica e entra na cavidade oral através dos ductos excretores, auxiliados também pela contração das células mioepiteliais (Carpenter, 2013; Granger & Taylor, 2020; Roblegg et al., 2019). A tonicidade da saliva

pode ser indicativa de um estado basal (não estimulado, mais hipotônico) ou estimulado (menos hipotônico) (Granger & Taylor, 2020).

As células acinares e mioepiteliais das glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autônomo, especificamente, pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. Os impulsos nervosos parassimpáticos produzem uma saliva de elevado fluxo e baixo teor proteico, enquanto que, os impulsos nervosos simpáticos produzem uma saliva de baixo fluxo e elevado teor proteico (Carpenter, 2013; Holmberg & Hoffman, 2014; Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019; Tvarijonavičiute *et al.*, 2020).

### 1.3.2. Composição

A saliva total consiste numa mistura de fluidos orais, incluindo secreções das glândulas salivares maiores e menores (ex: água, proteínas, eletrólitos, pequenas moléculas orgânicas) e ainda outros componentes de origem não salivar, tais como: moléculas provenientes do sangue (ex: sangramento intraoral e fluido crevicular gengival); células epiteliais de escamação (ex: queratinócitos); outros fluidos (ex: secreções brônquicas e nasais expetoradas); substâncias extrínsecas ao organismo (ex: restos de alimentos, componentes de pasta de dentes ou elixir bucal) e microbiota (ex: bactérias e produtos bacterianos, vírus e fungos) (Dawes & Wong, 2019; de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Kaufman & Lamster, 2002).

Os principais constituintes salivares derivados das glândulas são os seguintes:

- Água e eletrólitos - Dependendo do nível de estimulação, o fluido salivar pode ser constituído por até 99% de água, sendo composto adicionalmente por eletrólitos derivados do plasma (ex: sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, cálcio, magnésio, fosfatos, etc), proteínas como mucinas (ex: MG1, MG2), enzimas (ex: lactoferrinas, lisozimas, peroxidases, sAA, etc), imunoglobulinas (ex: IgA, IgG e IgM), PRP (proteínas ricas em prolina), cistatinas (proteínas ricas em cisteína), histatinas (proteínas ricas em histidina), estaterinas e catelicidinas. Para além disso, contém ainda pequenas moléculas orgânicas

(ex: aminoácidos, creatinina, glucose, lípidos, azoto, ureia e ácido úrico) e hormonas (ex: cortisol, estriol, estradiol, tiroxina, testosterona, leptina, adiponectina e grelina) (Carpenter, 2013; de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

Para além destas, há ainda outras proteínas, normalmente presentes em quantidades mais baixas (ex: albumina, cromogranina A (CgA)) (Carpenter, 2013; de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

Existe uma grande variabilidade em termos individuais na taxa de secreção salivar, no entanto, em condições saudáveis, a produção diária média de saliva varia entre 1-1,5 L, sendo o seu pH ligeiramente ácido, variando entre 6 e 7 (de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019). Quando não há nenhum estímulo particular, a induzir a produção de saliva (saliva não estimulada), a contribuição das diferentes glândulas salivares em termos percentuais é: 20% pelas PG, 65% pelas SMG, 7-8% pelas SLG e menos de 10% por numerosas glândulas menores (de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019; Tvariionaviciute *et al.*, 2020). A contribuição das PG aumenta consideravelmente com estímulos como a mastigação (Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

Apesar da maioria das proteínas presentes na saliva ser secretada pelas glândulas salivares, existem grandes diferenças entre as glândulas relativamente ao tipo de secreção e às proteínas que sintetizam (Carpenter, 2013). As secreções salivares podem ser do tipo seroso, mucoso ou misto. Por exemplo, as PG secretam uma secreção serosa rica em iões e enzimas, que não contém mucinas, mas é rica em amílase e proteínas ricas em prolina (PRPs). As secreções mucosas, produzidas principalmente pelas glândulas menores, são ricas em mucinas e apresentam pouca ou nenhuma atividade enzimática. Nas SMG e SLG, o conteúdo salivar depende da proporção entre células serosas e mucosas, sendo a saliva produzida por estas glândulas do tipo misto. No que diz respeito a PRPs, esta família é constituída por 3 grupos principais: ácidas, básicas e glicosiladas. As PRPs básicas parecem encontrar-se exclusivamente na secreção das PG, enquanto que as PRPs ácidas aparecem nas secreções das glândulas SMG e PG. No entanto, algumas proteínas são universais para todas as glândulas, como a IgA secretora (principal imunoglobulina

presente na saliva) (Carpenter, 2013; de Almeida *et al.*, 2008; Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

A composição da saliva pode também ser afetada por situações fisiológicas como o caso da idade, sexo, peso corporal, ritmo circadiano, hidratação individual, tabagismo, medicação, estimulação visual ou olfativa, distúrbios sistémicos ou doenças bucais, stress e exercício físico, que é o alvo deste trabalho (de Almeida *et al.*, 2008; Franco-Martínez *et al.*, 2020; Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020).

### 1.3.3. Função

A saliva tem diversas funções e, de modo a manter a saúde bucal e criar um equilíbrio ecológico apropriado, a função salivar pode ser agrupada em 5 categorias principais (Humphrey & Williamson, 2001; Tvariionaviciute *et al.*, 2020):

#### 1 - Proteção e lubrificação:

A saliva forma um revestimento seromucoso que lubrifica e protege os tecidos orais contra agentes irritantes e possíveis patogéneos. Os melhores componentes lubrificantes da saliva são as mucinas, que são excretadas pelas glândulas salivares menores, pelas SMG e SLG. Estas são das principais proteínas responsáveis pela lubrificação, proteção contra a desidratação e manutenção da viscoelasticidade salivar, auxiliando nos processos de mastigação, deglutição e fala (Dawes *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2008; Roblegg *et al.*, 2019).

#### 2 - Ação tampão e depuração:

A ação tampão e depuração da saliva é realizada através dos seguintes componentes: bicarbonato, fosfato, ureia e proteínas e enzimas anfotéricas. A saliva comporta-se como um sistema tampão de modo a proteger a cavidade oral da colonização de potenciais microrganismos patogénicos e neutraliza os ácidos produzidos por alguns microrganismos, prevenindo a desmineralização do esmalte. O bicarbonato é o sistema tampão mais importante. Este difunde-se na placa e atua como um tampão neutralizando os ácidos. Além disso, gera amónia para formar aminas, que também servem como

tampão por ácidos neutralizantes. A ureia, outro tampão presente na saliva, liberta amónia após ser metabolizada pela placa e, assim, aumenta o pH da placa (Dawes & Wong, 2019; Roblegg *et al.*, 2019).

### 3 - Manutenção da integridade dos dentes:

A saliva desempenha um papel importante na manutenção da integridade físico-química do esmalte dentário modulando a remineralização e desmineralização. Os principais fatores que controlam a estabilidade da hidroxiapatite do esmalte são as concentrações de íons livres de cálcio, fosfato e flúor em solução e o pH salivar (Carpenter, 2013; Dawes & Wong, 2019).

### 4 - Atividade antibacteriana:

Apesar de não ser essa a sua principal função, as mucinas têm também uma função antibacteriana pois modulam seletivamente a adesão de microorganismos às superfícies dos tecidos orais, contribuindo para o controlo bacteriano e fúngico. As IgA secretoras, que constituem a maior parte do conteúdo imunológico da saliva, atuam como neutralizadoras de bactérias e vírus, servindo como um anticorpo para os antígenos bacterianos e, atuam agregando ou aglomerando bactérias, inibindo assim a sua fixação aos tecidos orais (Dawes & Wong, 2019; Roblegg *et al.*, 2019). Existem ainda algumas outras proteínas como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, estaterina e histatina que também apresentam funções antimicrobianas (Dawes & Wong, 2019).

### 5 - Paladar e digestão:

A hipotonicidade da saliva melhora a capacidade de degustação de alimentos e fontes de nutrientes, em particular, o gosto salgado, porque os recetores gustativos são adaptados às concentrações salinas basais (Dawes *et al.*, 2015; Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019). A capacidade de degustação depende da presença de proteínas, nomeadamente, a gustina (também conhecida como CA VI) (Barbarossa *et al.*, 2015), que se liga ao zinco (Humphrey & Williamson, 2001). A saliva é ainda responsável pela digestão inicial do amido, através da amilase, auxiliando na formação do bolo alimentar, ajudando também na deglutição. A  $\alpha$ -amilase, produzida principalmente nas PG e também nas SMG, tem como função biológica dividir o amido em maltose, maltotriose e dextrinas (Carpenter, 2013; Dawes *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2008;

Humphrey & Williamson, 2001; Roblegg *et al.*, 2019), moléculas estas com propriedades doces. A participação da saliva na percepção gustativa foi já detalhada no ponto 1.2., neste trabalho.

#### **1.4. Relação do exercício físico com a percepção gustativa e com a saliva**

##### **1.4.1. Relação do exercício físico com a percepção gustativa**

A sensibilidade gustativa (sensibilidade ao gosto) difere entre os indivíduos para as diferentes qualidades do gosto. Existe uma variação considerável no grau de percepção do paladar, havendo um elevado número de fatores que a podem influenciar: idade, sexo, genética, sono, IMC, nível de ansiedade, neurotransmissores, fatores hormonais, dieta, temperatura dos alimentos, número de células recetoras do gosto, entre outros. A atividade física pode potencialmente influenciar estes fatores modificáveis associados às diferenças na percepção gustativa (Feeney *et al.*, 2019; Wardhani *et al.*, 2011).

De acordo com diversos estudos, realizados até ao momento, a intensidade gustativa percebida difere entre homens ativos e inativos. Os homens ativos mostraram uma intensidade percebida maior para o gosto doce, comparativamente a homens sedentários (Feeney *et al.*, 2019; Vidanage *et al.*, 2022). No estudo de Wardhani *et al.* (2011), também se observou que após umas semanas de realização de exercício físico aeróbico, os participantes masculinos apresentaram um aumento na sensibilidade para o gosto doce.

Esta diferença, na percepção do gosto doce, de acordo com o nível de atividade física, também se observou no sexo feminino, sendo que, no estudo de Crystal *et al.* (1995), onde nadadoras e mulheres inativas foram comparadas, observou-se que as nadadoras perceberam os estímulos com alto teor de sacarose como mais doces, comparativamente a mulheres inativas. Numa revisão feita por Gauthier e colaboradores (Gauthier *et al.*, 2020), a sensibilidade ao gosto doce foi aumentada pelo exercício físico

agudo (Ali *et al.*, 2011; Crystal *et al.*, 1995; Feeney *et al.*, 2019; Narukawa *et al.*, 2009; Vidanage *et al.*, 2022), mas, nenhuma variação significativa foi obtida para o gosto amargo (Feeney *et al.*, 2019; Nakagawa *et al.*, 1996).

#### **1.4.2. Relação do exercício físico com a composição da saliva**

A saliva tem vindo a ganhar relevância como sendo um fluido para diagnóstico clínico e forense, bem como para análise na área da atividade física e nutricional. A sua colheita é fácil, não invasiva, sem dor e desconforto e contém um grande número de analitos afetados por uma série de agentes de stress fisiológicos e patológicos (de Araujo *et al.*, 2018; Pacheco *et al.*, 2022; Rutherford-Markwick *et al.*, 2017; Ventura *et al.*, 2022).

O exercício físico pode induzir alterações na atividade do sistema nervoso autónomo, nomeadamente, no balanço entre os ramos simpático e parassimpático, podendo assim alterar a secreção salivar, alterando a expressão de vários constituintes (Leicht *et al.*, 2018; Ligtenberg *et al.*, 2016; Ventura *et al.*, 2022). A concentração de proteínas salivares pode aumentar com uma estimulação simpática das glândulas salivares por catecolaminas, que se expressam mais aquando de um exercício anaeróbico (Ventura *et al.*, 2022).

O aumento da secreção de proteínas e componentes imunes após a prática de exercício pode ser explicado pela regulação neuronal da secreção de saliva (Proctor & Carpenter, 2014). As glândulas salivares são inervadas tanto pelos nervos simpáticos como pelos parassimpáticos. A estimulação parassimpática provoca um alto volume de saliva aquosa com baixo teor proteico. A saliva produzida pela estimulação simpática, que é a predominante durante o exercício, possui um baixo volume e alto teor de proteínas. Esta diferença na sinalização pode levar a um aumento na expressão e na secreção de proteínas mesmo que a secreção de fluidos seja reduzida (Ligtenberg *et al.*, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2019).

O transporte geral de grânulos de secreção nas células das glândulas salivares pode ser aumentado pela sinalização  $\beta$ -adrenérgica que é ativada pelo exercício físico

através da inervação pelos neurónios simpáticos (Sant'Anna *et al.*, 2019). O exercício físico pode alterar a secreção e induzir variações em vários componentes salivares como: imunoglobulinas, lactato, proteínas e eletrólitos (de Almeida *et al.*, 2008).

No estudo de Franco-Martínez *et al.* (2020), o proteoma salivar mostrou diferenças, associadas ao sexo, entre o repouso e o período após a prática de exercício. Algumas proteínas foram observadas como sendo moduladas (sofrendo uma diminuição) após o exercício em ambos os sexos. Por outro lado, algumas proteínas apresentaram um comportamento diferente após o exercício entre homens e mulheres. Uma proteína apresentou uma grande diminuição nos homens após o exercício e uma diminuição menos evidente nas mulheres e quatro proteínas apresentaram grandes aumentos na sua concentração após o exercício em homens, mas sofreram diminuições após o exercício nas mulheres (Franco-Martínez *et al.*, 2020).

Algumas alterações salivares podem ser devidas à passagem de moléculas do sangue para a saliva. Após um exercício agudo, o tecido muscular pode ser danificado por fatores metabólicos e mecânicos e libertar componentes intracelulares como creatina quinase, mioglobina ou troponina, para o compartimento extracelular. Esses compostos intracelulares libertados espalham-se então pela corrente sanguínea e, posteriormente, podem atingir a saliva por fluxo ativo ou passivo (Franco-Martínez *et al.*, 2020).

O exercício modula tanto a parte inata como a adquirida do sistema imunológico e ativa os dois principais ramos neuroendócrinos de resposta ao stress do sistema nervoso simpático: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o eixo simpático-adreno-medular (SAM) (de Souza *et al.*, 2021; Honceriu *et al.*, 2021; Rutherford-Markwick *et al.*, 2017). Enquanto que a ativação do SAM, anteriormente referida, é uma resposta imediata ao exercício, o eixo HPA mostra uma resposta um pouco mais lenta. A resposta de cada um dos eixos HPA e SAM ao exercício depende de vários fatores, incluindo a intensidade do exercício, a duração, as condições do treino e as hormonas sexuais (Rutherford-Markwick *et al.*, 2017).

Dada a regulação da salivação referida nos parágrafos anteriores, a saliva transporta dois marcadores primários de ativação do SAM e eixo HPA, a  $\alpha$ -amílase e o cortisol, respetivamente. A  $\alpha$ -amílase, cujos níveis aumentam em resposta à ativação do ramo simpático, relaciona-se com os níveis dos marcadores sanguíneos estabelecidos para

o eixo SAM, epinefrina e norepinefrina (Rutherford-Markwick *et al.*, 2017). É por isso muito usada para avaliação de stress resultante da ativação deste sistema. Já o cortisol salivar, representa a forma livre de cortisol em circulação, sendo um bom indicador da atividade do eixo HPA. A utilização de cortisol salivar para avaliação de stress tem sido feita em diversos trabalhos (Jones *et al.*, 2020; Strahler *et al.*, 2017). Dada a diferente informação que amílase e cortisol podem dar, muitos estudos têm usado estes dois parâmetros salivares em combinação. No estudo de Rutherford-Markwick *et al.* (2017) observou-se que a relação entre a atividade da  $\alpha$ -amílase e os níveis de cortisol produzidos durante o exercício deram tendências opostas para homens e mulheres. Os homens mostraram um aumento coordenado de cortisol e  $\alpha$ -amílase, enquanto que, as mulheres exibiram uma relação negativa, indicando que os eixos de stress funcionam de forma independente.

No estudo de Pacheco *et al.* (2022) observou-se que a  $\alpha$ -amílase teve uma maior expressão em indivíduos com prática regular de exercício físico relativamente a indivíduos mais sedentários. Nos estudos de Rutherford-Markwick *et al.* (2017), De Pero *et al.* (2021), Honceriu *et al.* (2021) e Weiss *et al.* (2019), foi observado que o exercício levou a um aumento nos níveis da amílase salivar. A ativação do sistema nervoso simpático em resposta ao exercício de alta intensidade favorece a secreção de  $\alpha$ -amílase diretamente na saliva, fazendo dela um potencial indicador de stress (Honceriu *et al.*, 2021; Weiss *et al.*, 2019).

A prática de exercício também tem benefícios na saúde oral. A mucina-7, lisozima C, albumina, cistatinas e PRPs sofreram um aumento na saliva estimulada após a prática de exercício físico. A albumina foi aumentada após um exercício moderado e um desporto de alta intensidade. O aumento da albumina na saliva parece estar relacionado com a prática de atividade física independentemente da sua intensidade (Ventura *et al.*, 2022).

Verificou-se ainda a alteração de outras proteínas e componentes devido à prática de exercício físico. No caso da catalase, após a prática de um exercício físico, os homens mostraram um maior aumento nos níveis desta proteína que as mulheres (Franco-Martínez *et al.*, 2020). Após um exercício de alta intensidade, verificou-se um aumento nos níveis de lactato e também na proteína total na saliva (de Araujo *et al.*, 2018). Com uma intensidade de exercício acima do limiar anaeróbico, a mucina MUC5B sofreu um

aumento na sua concentração, sugerindo-se que o aumento da concentração de MUC5B cause o aumento da viscosidade salivar (Ligtenberg *et al.*, 2016). No estudo de Sant'Anna *et al.* (2019), observou-se um claro aumento dos níveis de cistatinas após os atletas realizarem várias atividades físicas extenuantes. Tanto os exercícios aeróbicos como anaeróbicos realizados com uma intensidade muito elevada levaram a um aumento da presença de cistatinas de tipo C e S (Sant'Anna *et al.*, 2019).

Alguns estudos têm mostrado que o exercício pode alterar o sistema imunológico, dependendo da intensidade e tipo de atividade (Ventura *et al.*, 2022). O exercício de intensidade moderada aumenta a secreção de IgA após a prática imediata, tendo efeitos estimulatórios sobre a IgA secretora (sIgA) (de Araujo *et al.*, 2018; Leicht *et al.*, 2018; Ventura *et al.*, 2022). No entanto, quando o exercício é de alta intensidade, mais exigente ou de resistência e de longa duração, a secreção de sIgA diminui (de Araujo *et al.*, 2018; Leicht *et al.*, 2018; Ligtenberg *et al.*, 2016).

Apesar de todos estes estudos, há algumas diferenças nos resultados, entre os mesmos, não sendo claro se o efeito do exercício, na salivação, está só dependente da intensidade do mesmo, ou se das características do praticante (se mais, ou menos habituado a uma prática regular). Para além disso, e apesar da participação da saliva na percepção gustativa e das potenciais alterações que esta sofre com o exercício (como referido nas secções anteriores), que seja do nosso conhecimento, há falta de estudos que relacionem as potenciais alterações salivares, decorrentes da prática de exercício físico com alterações na sensibilidade gustativa, decorrentes da mesma.

## **Capítulo II – Problemática e Objetivos**

## **2. Problemática e Objetivos**

### **2.1. Problemática**

A prática de exercício físico produz alterações fisiológicas e alterações no apetite. Há estudos que mostram que a própria percepção gustativa é modificada por essa prática, podendo esta percepção afetar a aceitação para bebidas ou alimentos. Tendo em conta a necessidade que pode existir para reidratar e readquirir nutrientes, após a prática de exercício (principalmente em desportistas que praticam exercício de alta intensidade), é importante compreender de que forma é que essa percepção é alterada e os mecanismos que estão por trás das alterações. A saliva é um fluido envolvido na percepção oral dos alimentos, incluindo a percepção gustativa e, ao mesmo tempo, um fluido suscetível de variação em diferentes condições. A prática de exercício é uma dessas condições que pode afetar a composição da saliva.

Apesar de existirem estudos que foquem estes dois aspetos: alterações na percepção gustativa e alterações na salivação após a prática de exercício, que seja do nosso conhecimento, faltam estudos que caracterizem as alterações bioquímicas salivares decorrentes do exercício, que associem à intensidade desse exercício e ao perfil do indivíduo (mais ou menos habituado à prática). Para além disso, falta uma integração entre estas alterações salivares e alterações na percepção gustativa.

### **2.2. Objetivo geral**

Este estudo teve como objetivo geral avaliar quais as alterações induzidas pelo exercício físico na composição bioquímica da saliva e na percepção gustativa em indivíduos com prática regular de exercício e sedentários.

### **2.3. Objetivos específicos**

- Avaliar a variação na percepção gustativa (doce e amargo) induzida pelo exercício;
- Avaliar a variação no proteoma salivar induzida pelo exercício;
- Avaliar o efeito na percepção gustativa da intensidade do esforço (HIIT vs. MICT), e do nível de treino (desportistas vs. sedentários);
- Avaliar a relação entre as alterações nos marcadores de stress salivares e proteoma salivar, induzidas pelo exercício, e as alterações no paladar.

## **Capítulo III – Metodologia**

### 3. Metodologia

#### 3.1. Aspetos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Évora (Documento GD/22025). As amostras só foram recolhidas após os participantes darem a sua aprovação e assinarem um consentimento informado, sendo esclarecidos sobre as condições do estudo.

#### 3.2. Participantes

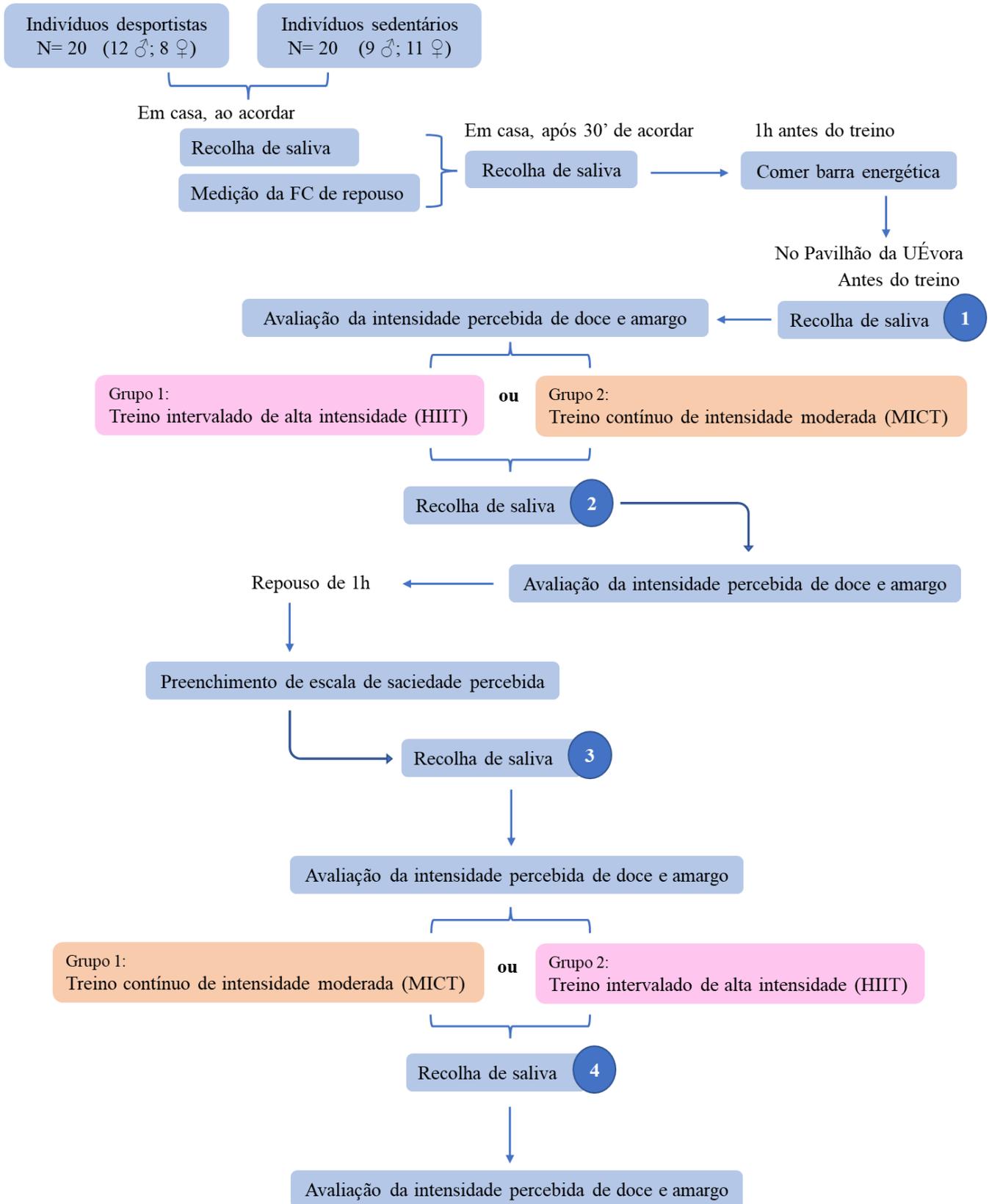
A seleção da amostra foi feita através do contacto, por parte dos investigadores do estudo, com alunos de diferentes licenciaturas e mestrados da Universidade de Évora.

Neste estudo os participantes foram distribuídos por dois grupos: um grupo com prática regular de exercício físico (indivíduos ativos), denominado “desportistas” e outro grupo (indivíduos sem prática regular de exercício físico), denominado “sedentários”. Considerou-se como prática regular a prática de 4 ou mais sessões de exercício físico por semana (sendo cada sessão de pelo menos 40 minutos) e como ausência de prática regular a realização de uma sessão ou menos de exercício físico por semana, de modo semelhante a classificações adotadas anteriormente por outros autores (Beaulieu *et al.*, 2017; Feeney *et al.*, 2019; Long *et al.*, 2002).

O estudo contou com uma amostra de 40 adultos voluntários: 12 rapazes desportistas, 8 raparigas desportistas, 9 rapazes sedentários e 11 raparigas sedentárias, com idades compreendidas entre os 18 e 29 anos. Todos declararam ser não fumadores e não apresentarem nenhuma doença, nem tomarem nenhum tipo de medicação.

Para a posterior análise apenas foram tidos em conta 36 participantes: 9 rapazes desportistas, 8 raparigas desportistas, 9 rapazes sedentários e 10 raparigas sedentárias, pois foram os indivíduos que cumpriram todo o protocolo na íntegra.

### 3.3. Desenho experimental



### 3.4. Ensaio experimental

No âmbito do ensaio experimental, (realizado de dezembro de 2021 a julho de 2022) foram pedidas algumas tarefas pré-ensaio, para realizar ainda em casa pelos participantes:

1) Ao acordar, fazer uma recolha de saliva, não estimulada e medição da frequência cardíaca (FC) em repouso.

Para a recolha de saliva, foi pedido para contar 4 minutos, durante os quais não estimulasse a produção e não engolissem saliva, sendo a totalidade deste fluido (produzido na boca) deitado para o tubo, o qual deveria ser imediatamente congelado após a recolha. Para a medição da FC em repouso, foi pedido para colocar 2-3 dedos na parte lateral do pescoço, ao nível da carótida e, contar quantas pulsações ocorreram durante 1 minuto.

2) 30 minutos após acordar, fazer uma nova recolha de saliva, seguindo o protocolo descrito anteriormente.

(Nota – As duas amostras de saliva recolhidas em casa, conforme referido no ponto 1) e 2) foram transportadas num saco térmico com barras de gelo, de modo a mantê-las refrigeradas. Ao chegar ao pavilhão gimnodesportivo foram imediatamente passadas para gelo, tendo sido armazenadas a -28 °C após a realização do ensaio).

3) 1h antes do treino (e sem ingerir nada antes, a não ser água), comer unicamente a barra energética distribuída anteriormente pelos investigadores do estudo.

O ensaio propriamente dito foi realizado no Pavilhão Gimnodesportivo da Universidade de Évora.

a. Ao chegarem, os participantes foram questionados acerca do valor da sua FC em repouso. Em caso de dúvida, foi feita a medição da FC de repouso (por parte de um dos investigadores a realizar o estudo, conforme referido no ponto 1)).

b. De seguida, foi feita uma recolha de saliva não estimulada (de acordo com o protocolo previamente descrito).

c. Posteriormente, realizou-se a avaliação da intensidade percebida de duas tiras impregnadas com soluções doces (0,165 g/mL de sacarose) e amargas (0,0024 g/mL de quinina), com ordem aleatória, através de uma escala LMS (Labeled Magnitude Scale) (Green *et al.*, 1996) (bebendo um pouco de água para limpar a boca do estímulo anterior e aguardando 30 segundos entre estímulos). A todos os participantes foi pedido que avaliassem a sua percepção gustativa, ou seja, a intensidade de resposta ao estímulo doce e amargo, antes e após cada exercício, através duma escala contínua LMS, com as indicações: “Escassamente detetado/Apenas detetado”, “Débil”, “Moderado”, “Forte”, “Muito forte” e “Mais forte do que o imaginável”.

d. Por fim, fez-se a realização do treino.

Cada indivíduo foi sujeito a dois tipos de treino na passadeira (Medisoft, 870A):

1) Um treino intervalado de alta intensidade (HIIT- High-Intensity Interval Training), em que houve uma alternância de alta intensidade com intensidade média.

Neste treino os participantes realizaram um minuto de corrida contínua (picos de intensidade de 1 minuto), para atingir 80-90% da FCM, seguido de um minuto de recuperação ativa a 70-75% da FCM, novamente um minuto de corrida intensa e assim sucessivamente, até um período de 20 minutos (Roy *et al.*, 2018) .

2) Um treino contínuo de intensidade moderada (MICT - Moderate-Intensity Continuous Training).

Neste treino os participantes realizaram 20 minutos de corrida contínua a uma intensidade de 65-75% da FCM (Wewege *et al.*, 2017) .

Ambos os treinos tiveram a duração de 20 minutos, sendo que, o controlo da intensidade do treino (FC) foi realizado pela utilização de um cardiofrequencímetro (Polar T31 - Coded Chest Strap).

A FCM foi calculada pela seguinte fórmula em função da idade:

$$\text{FCM} = 220 - \text{idade} \quad (\text{Roy } et \text{ al.}, 2018)$$

No final de cada treino (HIIT e MICT), imediatamente a seguir, foi feita uma nova recolha de saliva e uma nova avaliação da intensidade percebida dos paladares doce e amargo. Entre os treinos foi feito um período de repouso de 1 hora, após o qual se repetiram os protocolos de recolha de saliva e avaliação da intensidade percebida dos paladares doce e amargo.

Todos os indivíduos passaram pelos dois tipos de treino (HIIT e MICT), sendo que metade, seleccionada de forma aleatória, começou pelo HIIT e a outra metade pelo MICT.

Durante o período de repouso de 1h entre cada treino, foi ainda pedido a cada participante que preenchesse 2 questionários: um deles com dados pessoais, questões de saúde e nível de saciedade, assinalando esta intensidade numa escala de 0-7; o outro foi um questionário de frequência alimentar (QFA) semiquantitativo, validado para a população adulta portuguesa (Lopes *et al.*, 2007) para avaliar a frequência de consumo de alimentos. Este QFA é um questionário de 86 itens, que inclui alimentos individuais e/ou grupos de alimentos e bebidas e avalia a frequência de ingestão alimentar habitual nos últimos 12 meses. O QFA não foi tido em conta para posterior análise já que era para além dos objetivos do presente trabalho.

### **3.5. Avaliação da taxa de secreção salivar**

A taxa de secreção salivar foi avaliada assumindo que a densidade da saliva é 1,0. Os tubos com as amostras de saliva foram pesados, sendo subtraído o peso do tubo vazio. O valor final foi dividido pelo número de minutos em que a saliva foi recolhida, neste caso, 4 minutos.

### **3.6. Análises laboratoriais das amostras de saliva**

Para a remoção do material insolúvel das amostras de saliva, estas foram descongeladas em gelo, pesadas (Balança analítica VWR) e, posteriormente, foram centrifugadas (Hermle Z323K) a 13000 g por 15 minutos a 4 °C. No final, o sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -28 °C, sendo utilizado para todas as análises laboratoriais subsequentes.

#### **3.6.1. Doseamento de proteína total – Método de Bradford**

Para a quantificação de proteínas totais das amostras de saliva, recorreu-se ao método de Bradford.

O método de Bradford é um método colorimétrico que se baseia na ligação do corante azul brilhante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) às proteínas. A ligação do corante à proteína causa uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm, sendo esse aumento da absorção em 595 nm monitorizado. Este ensaio é amplamente utilizado por ser muito reprodutível e rápido, estando o processo de ligação do corante praticamente completo em aproximadamente 2 min com boa estabilidade de cor por 1 h. O método foi realizado utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, resultando num padrão de resposta altamente reprodutível (Bradford, 1976).

Para a quantificação de proteína total preparou-se uma curva padrão com BSA com concentrações de 0-200 µg/mL (Tabela 3.1). As amostras foram descongeladas e diluídas 4x, 8x e 12x, de modo a garantir que pelo menos uma das diluições correspondesse a valores para os quais o método apresenta linearidade (Tabela 3.2). Pipetou-se 10 µL de amostra/padrão e 200 µL de reagente de Bradford para uma

microplaca de 96 poços, em triplicado. A absorvência foi lida a 600 nm num leitor de microplacas (Glomax da Promega). O reagente de Bradford foi previamente preparado dissolvendo 100 mg de azul de coomassie G-250 em 50 mL de etanol a 95% e 100 mL de ácido fosfórico a 85%, perfazendo o restante volume com água destilada até 1 L de volume final. Este reagente foi sempre armazenado no frigorífico a 4 °C, entre utilizações.

Após a leitura de absorvência na microplaca, foi construída a curva padrão de BSA ou curva de calibração onde foram interpolados os valores de concentração proteica para as amostras de saliva (Figura 3.1).

*Tabela 3.1 - Preparação das soluções de BSA para a curva padrão*

[BSA] (µg/mL)	V (solução BSA) (µL)	V (água ultrapura) (µL)
<b>200</b>	100 (solução 2000 µg/mL)	900
<b>150</b>	750 (solução 200 µg/mL)	250
<b>100</b>	666,6 (solução 150 µg/mL)	333,3
<b>75</b>	750 (solução 100 µg/mL)	250
<b>50</b>	666,6 (solução 75 µg/mL)	333,3
<b>25</b>	500 (solução 50 µg/mL)	500
<b>0</b>	0	1000

*Tabela 3.2 - Volumes para a preparação das diluições das amostras*

Diluição	V (amostra) (µL)	V (água ultrapura) (µL)
<b>4x</b>	10	30
<b>8x</b>	5	35
<b>12x</b>	5	55

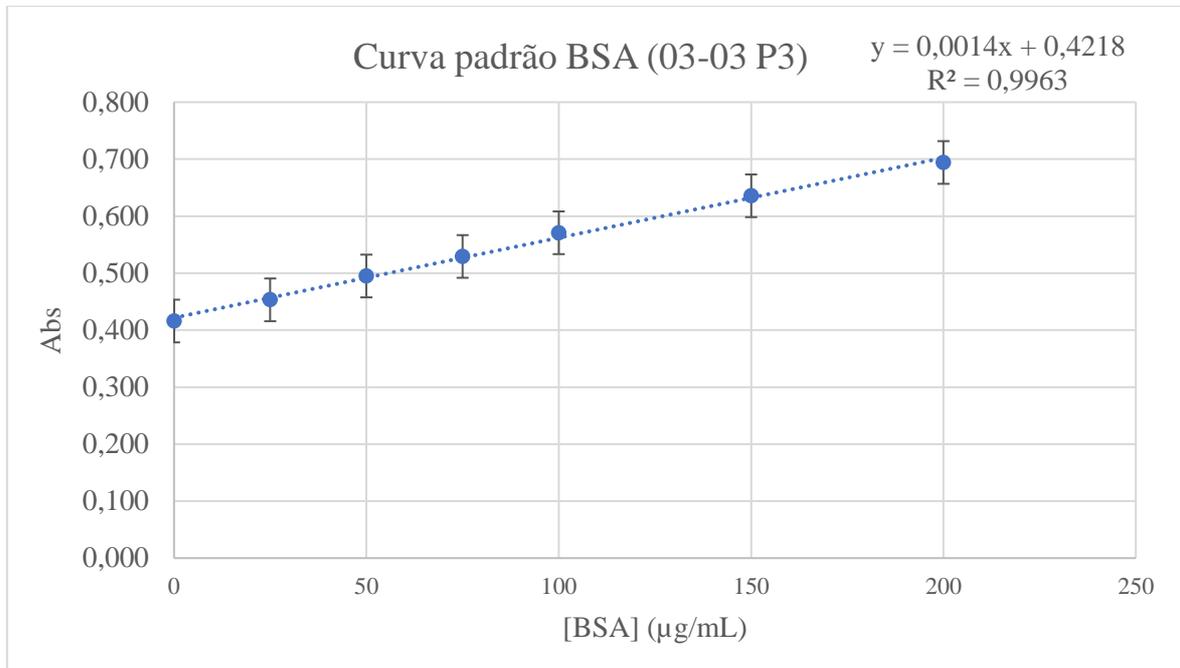


Figura 3.1 - Curva padrão de BSA para a determinação da concentração proteica.

### 3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é uma técnica usada para a separação de moléculas proteicas de acordo com o seu tamanho, sendo que, a distância migrada pelas proteínas depende da sua massa molecular (MW). Como a eletroforese utiliza SDS como agente solubilizante, é geralmente chamada de "eletroforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida de sódio" ou simplesmente SDS-PAGE. O SDS é um detergente que desnatura estruturas secundárias e terciárias de proteínas não ligadas por dissulfeto e as reveste com uma carga negativa que se correlaciona com o seu comprimento, permitindo que as massas moleculares sejam estimadas. Este método é simples, relativamente rápido e pouco dispendioso, sendo por isso bastante utilizado (Brunelle & Green, 2014; Matsumoto *et al.*, 2019).

O processo de SDS-PAGE a 14% foi dividido em três etapas: preparação dos géis, preparação das amostras e corrida eletroforética.

Para a preparação dos géis, primeiramente, foram alinhados os vidros de 1,0 mm e montado todo o sistema para a eletroforese. Posteriormente, foi preparado o gel de resolução (13,95 mL de Acrilamida/bis 30%; 8,25 mL de água destilada; 7,5 mL de Tris 1,5 M pH 8,8; 300 µL de SDS 10%; 225 µL de APS; 15 µL de TEMED (adicionando, por último, os agentes polimerizadores, APS e TEMED)). Após a colocação da solução nos vidros, deitou-se água destilada por cima, para impedir o contacto entre a solução do gel com o ar atmosférico, uma vez que a acrilamida polimeriza na ausência de oxigénio.

Uma vez tendo o gel de resolução polimerizado, preparou-se o gel de concentração (1,06 mL de Acrilamida/bis 30%; 4,86 mL de água destilada; 2 mL de Tris 0,5 M pH 6,8; 80 µL de SDS 10%; 48 µL de APS; 8,8 µL de TEMED (adicionando, por último, os agentes polimerizadores, APS e TEMED)). Antes de adicionar a solução aos vidros, retiraram-se os mesmos do sistema para remoção da camada de água aplicada anteriormente. Depois de removida a água, aplicou-se o gel de concentração e colocaram-se os pentes por cima.

Enquanto a solução polimerizava, prepararam-se as amostras para a corrida eletroforética. Para as amostras de saliva, considerou-se a mesma quantidade de proteína total de todas as amostras, neste caso, 7 µg de proteína total. Calculou-se o volume de cada amostra correspondente a 7 µg de proteína e o volume de tampão de amostra 6x, 2x e 1x a adicionar. Pipetou-se para um novo tubo os volumes de amostra e de tampão calculados e aqueceram-se as amostras a 98 °C durante 5 minutos, em banho seco (Fisher Scientific, FB15103). Após o aquecimento, passaram-se de imediato as amostras para gelo.

Para a montagem do sistema para a corrida eletroforética, primeiramente, retiraram-se os géis e os pentes do sistema e colocaram-se os géis num novo sistema com eléctrodos. Deitou-se o tampão de corrida 1x (0,0025 M de Tris; 0,0192 M de glicina; 0,1% (m/V) de SDS) na tina eletroforética, no reservatório criado com a junção dos géis e, após verificar que não havia fugas de tampão, deitou-se o tampão na parte de fora do sistema, que contacta com a parte inferior do gel. Aplicou-se 3 µL do marcador de massas moleculares (Millipore MPSTD4) num dos poços de cada gel e aplicaram-se as amostras (volume total) nos poços do gel. Colocou-se a tampa no sistema, ligaram-se os cabos à

fonte de alimentação, selecionou-se uma voltagem constante de 150 V para a corrida e iniciou-se a corrida eletroforética (BioRad).

Após o término da corrida (indicado pela chegada da frente de corrida ao fim do gel), retiraram-se os géis do sistema para posterior coloração. Inicialmente colocaram-se os géis numa solução de fixação de 40% de metanol e 10% de ácido acético, por uma hora, em agitação. De seguida, os géis foram colocados durante uma hora numa solução corante Azul brilhante de Commassie R-250. Por último, descoraram-se os géis numa solução de 10% de ácido acético, realizando diferentes mudas da solução até o fundo (*background*) deixar de ter coloração azul.

Finalmente, colocaram-se os géis em água destilada durante algum tempo e digitalizaram-se no scanner ImageScanner III (Epson), utilizando o *software* LabScan (GE Healthcare). Os ficheiros resultantes da digitalização foram então guardados em 2 formatos: .mel e .tiff para posterior análise. A análise dos géis SDS-PAGE foi realizada com recurso ao *software* ImageLab (BioRad).

### 3.6.3. Determinação da atividade enzimática da $\alpha$ -amílase

A  $\alpha$ -amílase presente nas amostras foi determinada pelo kit “Salivary  $\alpha$  -amylase kinetic enzyme assay” (Salimetrics ®). O método para determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -amílase utiliza um substrato cromogénico, 2-cloro-p-nitrofenol ligado a maltotriose. A ação enzimática da  $\alpha$ -amílase sobre este substrato origina 2-cloro-p-nitrofenol, que pode ser medido espectrofotometricamente a 405 nm. A quantidade de atividade da  $\alpha$ -amílase presente na amostra é diretamente proporcional ao aumento de absorção a 405 nm. A reação foi lida em microplacas de 96 poços com controlos fornecidos.

Para a aplicação deste método, primeiramente, os reagentes foram preparados e foi determinada a disposição dos controlos e das amostras na microplaca de 96 poços. O substrato da  $\alpha$ -amílase foi aquecido a 37 °C (Agitador orbital Grant-Bio), por um período mínimo de 20 minutos. As amostras de saliva foram diluídas 200x com o diluente de  $\alpha$ -amílase fornecido, constituído por tampão fosfato. Adicionou-se, a cada poço na

microplaca, 6 µL de amostra ou de um dos 2 controlos fornecidos e 240 µL de substrato, previamente aquecido. O tempo começou a contar imediatamente após estes passos, sendo a microplaca agitada a 500-600 rpm a 37 °C. A microplaca foi transferida para o espectrofotómetro para a leitura da densidade óptica (OD) após exatamente 1 minuto, tendo voltado para a agitadora a 37 °C posteriormente. Após 2 minutos a 37 °C, a microplaca foi transferida novamente e feita a leitura exatamente aos 3 minutos. As leituras de 1 e 3 minutos foram realizadas num espectrofotómetro (BioRad modelo 680) a 405 nm.

Para o tratamento dos dados, foi subtraída a leitura de OD de 3 minutos à de 1 minuto e multiplicada pela conversão do fator. A conversão do fator teve em conta a diluição de 1:200 para os controlos e amostras pré-diluídas.

Os cálculos da atividade enzimática da amílase (U/L), foram feitos através da seguinte equação:

$$\frac{\frac{\Delta Abs}{\min} \times TV \times DF}{MMA \times SV \times LP} = \text{U/L de atividade da } \alpha\text{-amílase na amostra, onde:}$$

- $\Delta Abs/\min$  – variação da absorvência por minuto (“absorbance difference per minute”);
- TV – volume total (“total assay volume”) (TV=0,246 mL);
- DF – fator de diluição (“dilution factor”) (DF=200);
- MMA – absorvidade molar do reagente 2-cloro-p-nitrofenol (“millimolar absorptivity of 2-chloro-p-nitrophenol”) (MMA=12,9);
- SV – volume de amostra (“sample volume”) (SV=6 uL=0,006 mL);
- LP – percurso óptico (“light path”) (LP=0,97).

#### 3.6.4. Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) é um método utilizado para a separação de proteínas de misturas biológicas complexas. Esta técnica

baseia-se na separação de proteínas com base nas suas propriedades físico-químicas, como o ponto isoelétrico e a massa molecular. Inicialmente, na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) ao longo de um gradiente de pH usando tiras de gradiente de pH imobilizadas. De seguida, na segunda dimensão, as proteínas desnaturadas são separadas de acordo com as suas massas moleculares recorrendo à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As tiras de gradiente de pH da primeira dimensão são depois alinhadas ao longo do topo de um gel de poliacrilamida e, uma vez aplicada a carga, as proteínas migram da tira para o gel e são separadas com base no seu tamanho usando SDS-PAGE. Por fim, esse processo resulta num gel 2D que, ao ser corado, evidencia umas manchas, sendo que, cada mancha corresponde a uma proteína (Meleady, 2018).

Considerando o número de amostras recolhidas para cada indivíduo (4 amostras contabilizadas para esta análise) e considerando as limitações técnicas e de análise relativamente à eletroforese bidimensional, selecionou-se uma subamostra de 9 indivíduos, contemplando apenas os rapazes desportistas. A seleção de amostras dos participantes apenas do sexo masculino e desportistas deveu-se ao facto da nossa amostra ser relativamente pequena, de haver conhecimento que o sexo é um fator de variação e pelo exercício físico (indivíduos desportistas) ser o alvo principal deste trabalho, sendo mais relevante verificar as possíveis alterações neste grupo. De modo a minimizar os erros técnicos, todas as amostras foram testadas em duplicado.

A técnica de eletroforese bidimensional é constituída por 4 etapas: a preparação das amostras, a reidratação das tiras com as amostras, a focagem das tiras e o equilíbrio e corrida eletroforética (SDS-PAGE).

#### **Preparação das amostras:**

Primeiramente, as amostras foram concentradas através do método de centrifugação (a 13000 g, 4 °C) (Hermle Z323K) em membranas com um *cut-off* de 3 kDa (PALL). O tempo de concentração das amostras é variável já que só se pode terminar o

processo quando houver uma concentração de 125 µg de proteína total num volume inferior a 25 µL.

### **Reidratação das amostras:**

Após a concentração das amostras, o volume de amostra obtido foi misturado com tampão de solubilização (7 M ureia; 2 M tioureia; 4% (m/V) Chaps; 2% (V/V) IPG buffer; 40 mM DTT), de modo a, misturando com a amostra, perfazer um volume final de 125 µL. Esta mistura foi a incubar durante uma hora à temperatura ambiente, sendo de seguida centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos (Eppendorf centrifuge 5424). Aplicou-se o sobrenadante de cada amostra nas ranhuras do sistema de reidratação (GE Healthcare). Colocaram-se as tiras de gel comerciais (com um gradiente de pH imobilizado (3-10) de 7 centímetros (IPG strips, GE Healthcare)) em contacto com a amostra, à temperatura ambiente, ficando em reidratação durante a noite e cobertas com óleo mineral (*Dry strip cover fluid*, GE healthcare).

### **Focagem das tiras:**

As tiras foram colocadas no sistema Multiphor II (GE Healthcare), após a reidratação, para focagem isoeletrica das proteínas (primeira dimensão). A focagem ocorreu a 18 °C durante 8 horas, sendo dividida em 4 etapas (Tabela 3.3).

*Tabela 3.3 - Características da focagem isoeletrica*

<b>Voltagem</b>	<b>Tempo</b>
Subida para 150 V	15 minutos
Subida para 300 V	1 hora
Subida para 3500 V	3 horas
Constante a 3500 V	4 horas 30 minutos

### **Equilíbrio e separação SDS-PAGE:**

Os passos de equilíbrio e separação por SDS-PAGE foram divididos em 3 etapas: a preparação dos géis, o equilíbrio das tiras e a corrida eletroforética.

Para a segunda dimensão (separação por massas moleculares) prepararam-se os géis SDS-PAGE da forma descrita anteriormente. Posteriormente, as tiras foram equilibradas num tampão de equilíbrio (6 M de ureia; 75 mM de Tris-HCl pH 8,8; 29,3% (V/V) de glicerol; 2% (m/V) de SDS; 0,002% (m/V) de azul de bromofenol). Em primeiro lugar, procedeu-se à redução com DTT. Adicionou-se DTT (1%) à solução de equilíbrio e juntou-se 5 mL desta solução a cada tira, incubando durante 15 minutos, com agitação, à temperatura ambiente. De seguida, descartou-se a primeira solução de equilíbrio (com DTT) para proceder ao segundo passo do equilíbrio. Em segundo lugar, procedeu-se à alquilação com iodoacetamida. Adicionou-se iodoacetamida (2,5%) à solução de equilíbrio e juntou-se 5 mL desta solução a cada tira, incubando novamente durante 15 minutos, com agitação, à temperatura ambiente. De seguida, descartou-se a segunda solução de equilíbrio (com iodoacetamida).

Por último, prepararam-se as tiras para a corrida eletroforética. As tiras foram lavadas com água destilada e foi removido o excesso de água com papel. Depois colocaram-se as tiras no topo de cada gel e adicionou-se 1 mL de uma solução de 0,5% de agarose (preparada em tampão de corrida 1x). Posteriormente, deitou-se o tampão de corrida 1x no sistema, enchendo a câmara interna e externa deste sistema. Para iniciar a corrida, ligou-se o sistema à fonte de alimentação, seleccionando uma voltagem constante de 150 V. A corrida eletroforética terminou quando a frente de corrida com azul de bromofenol atingiu o fim do gel.

Após o término da corrida retiraram-se os géis do sistema para posterior coloração. Inicialmente, colocaram-se os géis numa solução de fixação de 40% de metanol e 10% de ácido acético, por uma hora, em agitação. De seguida, os géis foram colocados durante uma hora numa solução corante Azul brilhante de Commassie R-250. Por último, descoraram-se os géis numa solução de 10% de ácido acético, realizando diferentes mudas da solução até o fundo (*background*) deixar de ter coloração azul.

Finalmente, colocaram-se os géis em água destilada durante algum tempo e digitalizaram-se no scanner ImageScanner III (Epson), utilizando o *software* LabScan (GE Healthcare). A análise dos perfis bidimensionais foi realizada com recurso ao *software* SameSpots (TotalLab).

### 3.7. Análise estatística

Os dados de intensidade percebida de doce e amargo, assim como respeitantes aos parâmetros salivares, foram avaliados relativamente à existência de distribuição normal, através do teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados não apresentavam distribuição normal trabalhou-se com os valores transformados (transformação logarítmica).

De modo a avaliar o efeito do exercício no paladar e na composição salivar, comparámos os valores de cada um dos parâmetros avaliados (sensibilidade para os paladares doce e amargo, concentração em proteína total, taxa de secreção, atividade enzimática de amílase e níveis de cada banda proteica) antes do exercício com os valores desse parâmetro após a prática de cada tipo de exercício (HIIT ou MICT) através de um modelo GLM (*general linear model*), com dois níveis para o fator período (*within-subjects* - antes e depois) e, em que se consideraram as variáveis intensidade de exercício (HIIT ou MICT), nível habitual de exercício do indivíduo (desportista ou sedentário) e sexo (homem ou mulher) como variáveis entre indivíduos (*between-subjects*). Para comparar valores de antes e depois do exercício, em cada um dos grupos (ou sub-grupos, como, por exemplo, mulheres sedentárias, etc), de forma separada e, para confirmar entre que pares se encontram as diferenças, aplicou-se o teste T-Student para amostras emparelhadas.

De modo a testar a existência de associação entre a variação na composição proteica da saliva e a variação na sensibilidade gustativa, foram feitos testes de correlação (Pearson) entre os parâmetros sensibilidade (para doce ou para amargo) e cada um dos parâmetros salivares. Tendo em conta que o objetivo era avaliar a relação da variação da saliva e não da saliva, a um determinado tempo, os parâmetros salivares foram tratados como rácios entre o valor depois e o valor antes do exercício.

A análise foi feita usando o *software* SPSS v.24. Considerou-se um valor de  $\alpha=0,05$ .

## Capítulo IV – Resultados

## 4. Resultados

Foram contabilizados para análise apenas 36 participantes: 9 rapazes desportistas, 8 raparigas desportistas, 9 rapazes sedentários e 10 raparigas sedentárias, pois foram os indivíduos que cumpriram todo o protocolo na íntegra.

Os dados com a caracterização da amostra dos dois grupos em estudo ( $n=36$ ), desportistas ( $n=17$ ) e sedentários ( $n=19$ ), são apresentados na Tabela 4.1, onde se observa a média da idade, peso, altura e índice de massa corporal (IMC) com o respetivo desvio-padrão. Quer as idades e alturas são semelhantes em indivíduos desportistas e sedentários, havendo apenas uma pequena tendência para maior peso por parte das mulheres sedentárias, relativamente às desportistas.

Tabela 4.1 - Caracterização da amostra (média  $\pm$  desvio padrão)

	Desportistas			Sedentários		
	Homens (n=9)	Mulheres (n=8)	Total (n=17)	Homens (n=9)	Mulheres (n=10)	Total (n=19)
<b>Média de Idade</b>	20,11 ( $\pm 1,05$ )	22,00 ( $\pm 3,96$ )	21,00 ( $\pm 2,89$ )	18,67 ( $\pm 0,71$ )	19,20 ( $\pm 1,32$ )	18,95 ( $\pm 1,08$ )
<b>Média de Peso (kg)</b>	68,33 ( $\pm 7,04$ )	56,50 ( $\pm 5,95$ )	62,76 ( $\pm 8,79$ )	71,11 ( $\pm 17,21$ )	64,90 ( $\pm 16,14$ )	67,84 ( $\pm 16,49$ )
<b>Média de Altura (m)</b>	1,76 ( $\pm 0,05$ )	1,59 ( $\pm 0,05$ )	1,68 ( $\pm 0,10$ )	1,79 ( $\pm 0,09$ )	1,62 ( $\pm 0,05$ )	1,70 ( $\pm 0,11$ )
<b>Média de IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,11 ( $\pm 2,40$ )	22,42 ( $\pm 3,26$ )	22,26 ( $\pm 2,75$ )	22,04 ( $\pm 3,96$ )	24,55 ( $\pm 5,38$ )	23,36 ( $\pm 4,81$ )

### 4.1. Efeito do exercício na sensibilidade gustativa

Considerando a totalidade dos dados (independentemente do tipo de exercício, prática habitual e sexo), há um aumento significativo na intensidade percebida de doce após a prática de exercício ( $2,12 \pm 0,21$  vs.  $2,5 \pm 0,21$ ,  $P=0,043$  antes e depois, respetivamente; média  $\pm$  erro padrão).

No entanto, também se observa uma interação significativa entre o período, o tipo de exercício e a prática habitual ( $P=0,045$ ), em que, no caso dos indivíduos desportistas, é o MICT aquele que aumenta a intensidade percebida de doce ( $1,61\pm 1,01$  vs.  $2,30\pm 1,35$ , antes e depois, respetivamente;  $P=0,018$ ), enquanto que, no caso dos indivíduos sedentários, é o HIIT que tende a aumentar essa sensibilidade ( $2,24\pm 2,19$  vs.  $2,97\pm 2,44$ , para antes e depois, respetivamente;  $P=0,135$ ), ainda que, no caso dos indivíduos sedentários, a variação não seja estatisticamente significativa (Figura 4.1).

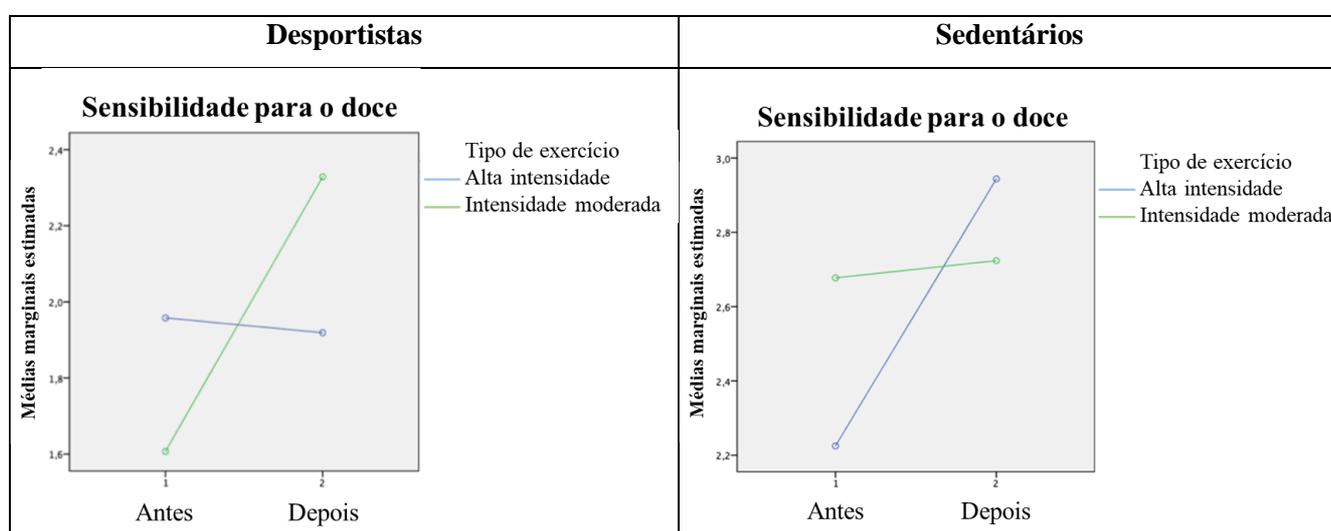


Figura 4.1 - Variação da intensidade percebida de doce, com o exercício, para indivíduos desportistas (esquerda) e sedentários (direita).

No que diz respeito à sensibilidade para o paladar amargo, observa-se uma interação entre o período e o tipo de exercício ( $P=0,044$ ) (Figura 4.2), em que, o HIIT evolui no sentido de um aumento da sensibilidade ao amargo e o MICT no sentido de uma diminuição. Apesar desta interação significativa, que mostra este diferente efeito do tipo de exercício, as diferenças entre antes e depois não chegam a ser estatisticamente significativas, para nenhum dos tipos de exercício, considerados separadamente ( $4,46\pm 2,73$  vs.  $5,04\pm 2,64$ ,  $P=0,176$ , antes e depois, respetivamente, para HIIT;  $5,70\pm 2,60$  vs.  $5,11\pm 2,18$ ,  $P=0,192$ , antes e depois, respetivamente, para MICT).

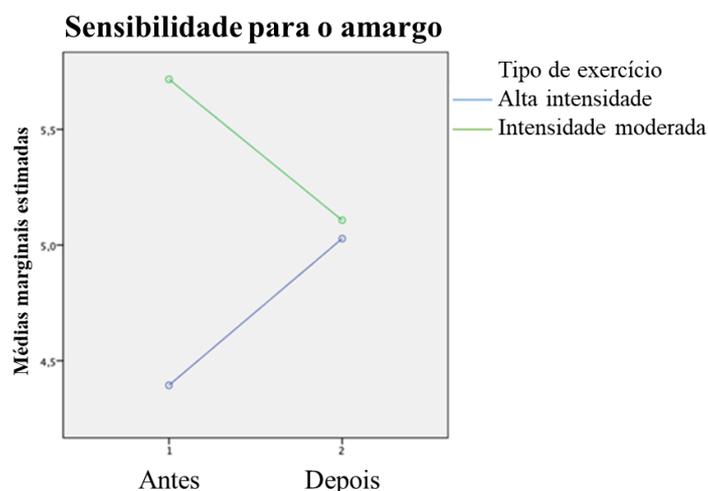


Figura 4.2 - Variação da intensidade percebida de amargo em função do tipo de exercício (alta intensidade ou intensidade moderada).

#### 4.2. Efeito do exercício na salivação e perfil proteico da saliva

No caso da taxa de secreção salivar, não se observam efeitos significativos do exercício (Tabela 4.2). No entanto, a concentração proteica varia significativamente ( $P=0,038$ ), observando-se um aumento da mesma com a prática de exercício. Aqui, não se observa efeito significativo de tipo de exercício ( $P=0,087$ , para interação período\*tipo de exercício), da prática habitual ( $P=0,352$ , para interação período\*prática habitual) ou do sexo ( $P=0,087$ , para interação período\*sexo). Ou seja, quer para o HIIT ou MICT, como para sedentários ou desportistas, como para homens ou mulheres, há um aumento (ou tendência para aumento) da concentração proteica salivar.

Tabela 4.2 - Efeito do exercício na taxa de secreção salivar e concentração proteica da saliva

Parâmetro	Antes	Depois	P
Taxa de secreção (mL/min)	0,37±0,28	0,34±0,24	0,262
Concentração proteica (µg/mL)	623,16±421,29	725,90±598,07	0,038

### 4.3. Efeito do exercício na atividade enzimática da amilase

A atividade enzimática da amilase não varia significativamente com o exercício, se forem considerados níveis de intensidade e sexo em conjunto. No entanto, há uma tendência para uma interação entre período e sexo ( $P=0,065$ ) e, olhando para os valores do antes e depois, para cada sexo em separado, observa-se um aumento estatisticamente significativo dos níveis de amilase, com o exercício, apenas no caso das mulheres ( $P=0,023$ ) (Tabela 4.3). Olhando só para o caso das mulheres, o aumento apenas é estatisticamente significativo com a prática do MICT (Tabela 4.3).

*Tabela 4.3 - Atividade enzimática da amilase salivar (U/mL), antes e depois da prática de exercício*

		Antes	Depois	P-value
<b>Homens</b>	<b>Total</b>	156,0±120,1	153,4±126,5	0,869
	<b>HIIT</b>	166,2±131,4	164,1±135,6	0,933
	<b>MICT</b>	145,8±110,5	142,7±119,8	0,876
<b>Mulheres</b>	<b>Total</b>	99,1±87,5	142,0±123,7	0,014
	<b>HIIT</b>	111,1±101,0	150,8±141,9	0,143
	<b>MICT</b>	87,0±72,7	133,2±106,0	0,048*

### 4.4. Efeito do exercício no perfil proteico salivar

A nível do perfil proteico salivar, através da separação proteica em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (técnica de SDS-PAGE), foi possível observar 25 bandas proteicas com resolução adequada e presentes na maioria dos perfis (Figura 4.3).

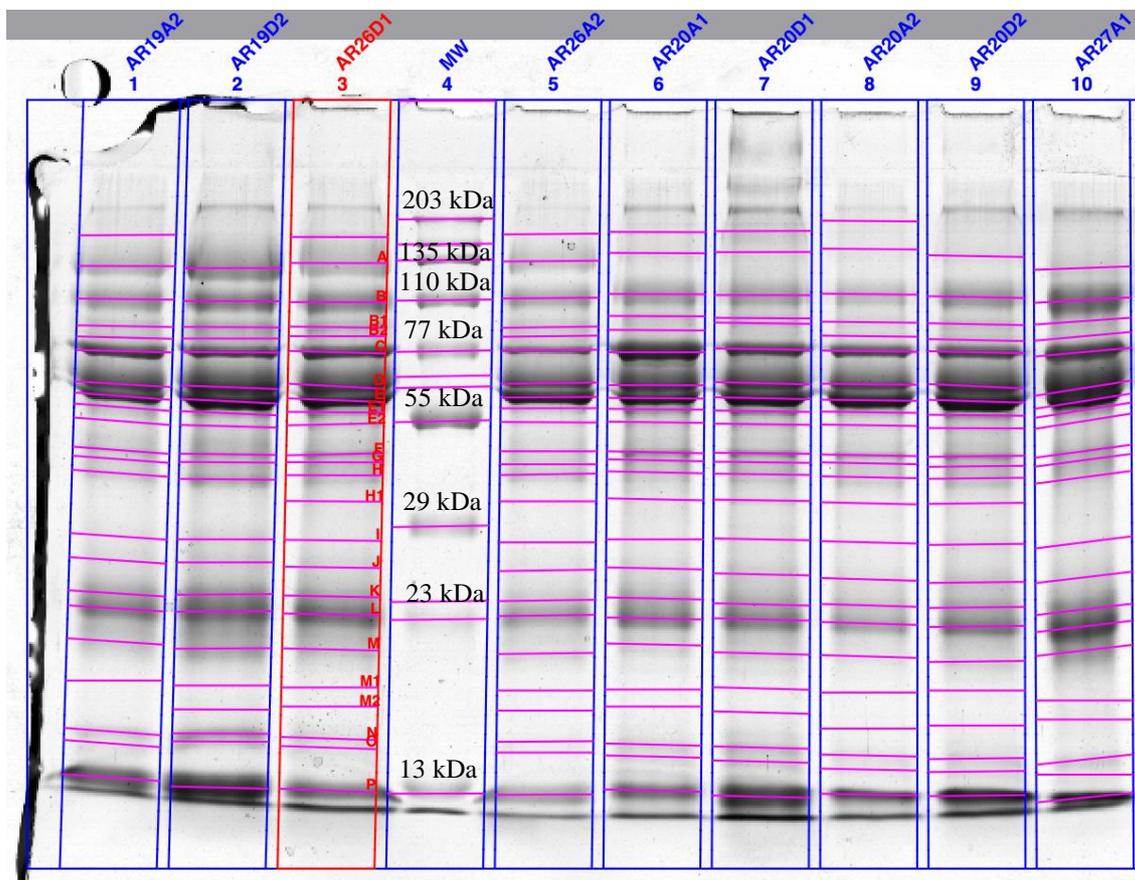


Figura 4.3 - Gel representativo do perfil proteico salivar obtido para as amostras analisadas. As lanes com os números de 1-3 e 5-10 representam diferentes amostras (com os respetivos códigos no topo da lane) e a lane 4 representa o padrão de massas moleculares utilizado. As letras de A a P representam as diferentes bandas proteicas presentes na maioria dos perfis.

De acordo com trabalhos anteriores, onde algumas destas bandas proteicas foram identificadas por espectrometria de massa (Carreira *et al.*, 2020), é expectável que a correspondência seja a apresentada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Identificações de proteínas potencialmente constituintes das bandas proteicas analisadas (baseado em resultados obtidos previamente para saliva humana (Carreira *et al.*, 2020))

Banda proteica	Massa molecular aparente (kDa)	Identificação
B	105	Recetor polimérico de imunoglobulinas

Ana Roque  
Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

C	79	Albumina
D	62	Amílase – forma glicosilada
E	58	Amílase – forma nativa
E1	56	Amílase (fragmento)
F	45	Zinco-alfa2-glicoproteína
G	43	Anidrase carbónica VI (CA VI)
L	23	Cadeia de imunoglobulinas
N	17	Proteína induzida pela prolactina (PIP)
O	16,5	Proteína induzida pela prolactina (PIP)
P	13,5	Cistatinas tipo S

O efeito do exercício e a forma como as variáveis (tipo de exercício, prática habitual e sexo) influenciam o perfil proteico salivar, foram avaliados para cada uma das bandas de forma univariada (Tabela 4.5).

Considerando só o fator período (antes e depois) independentemente de outros fatores, as bandas C, D, G, H, I e P variaram os seus níveis de expressão. No caso das bandas C (albumina), D (amílase – forma glicosilada) e G (CA VI) observou-se uma diminuição na proporção destas bandas, enquanto, para os casos das bandas H (n.i.), I (n.i.) e P (cistatinas tipo S) o exercício induz um aumento dos níveis destas bandas.

Considerando o fator tipo de exercício (e a interação entre este e o período antes e depois), este afeta as alterações induzidas pelo exercício (induzindo aumentos ou diminuições) nalgumas bandas proteicas: E1 (amílase (fragmento)), E2 (n.i.), F (zinco-alfa2-glicoproteína), J (n.i.), K (n.i.), L (cadeia de imunoglobulinas) e N (proteína induzida pela prolactina (PIP)). No caso da banda E (amílase – forma nativa) também parece haver uma tendência para ser o HIIT a ter efeito (induzindo um aumento), mas isso nos desportistas, porque no caso dos sedentários parece bastar o MICT para haver aumentos nos níveis desta banda (Tabela 4.5).

Considerando só o fator prática habitual de exercício, os sedentários e desportistas são diferentes no efeito que o exercício produz a nível das bandas: B1 (n.i.), E1 (amílase (fragmento)), G (CA VI), J (n.i.), L (cadeia de imunoglobulinas) e N (PIP) (Tabela 4.5).

Considerando o sexo, a forma como as bandas proteicas B (recetor polimérico de imunoglobulinas) e F (zinco-alfa2-glicoproteína) variam com o exercício não é igual em mulheres e homens, com a banda B a aumentar, no depois, só no caso das mulheres e a banda F a diminuir, só no caso dos homens (Tabela 4.5).

Até aqui, foram apresentados os efeitos de cada um dos fatores individuais. No entanto, ao olhar para as variações entre o período antes e depois da prática de exercício, tendo em conta a forma como o tipo de exercício (HIIT ou MICT), a prática habitual do mesmo (sedentários ou desportistas) e o sexo as podem influenciar, observam-se os seguintes resultados (Tabela 4.5):

- 1) No caso das bandas B (recetor polimérico de imunoglobulinas) e F (zinco-alfa2-glicoproteína), há uma diminuição nos níveis de expressão destas bandas, com o HIIT, no caso das mulheres.
- 2) A banda B1 (n.i.) diminui com o exercício, mas esta diminuição é particularmente observada no caso dos desportistas.
- 3) As bandas E (amílase – forma nativa), E1 (amílase (fragmento)), J (n.i.), L (cadeia de imunoglobulinas) e N (PIP) sofrem o efeito do exercício, mas esse efeito é dependente do tipo de atividade e da prática habitual de exercício. No caso da banda E (amílase – forma nativa), observam-se aumentos, nos níveis desta banda, mais evidente nas mulheres sedentárias, aquando do MICT, havendo também tendência para aumento desta banda nos desportistas, mas neste caso, provocado pelo HIIT. A banda E1 (amílase (fragmento)) diminui significativamente, apenas no caso dos indivíduos sedentários, quando expostos ao HIIT. No caso das bandas L (cadeia de imunoglobulinas), J (n.i.) e N (PIP) é o MICT que faz variar, apenas no caso dos desportistas, induzindo um aumento.
- 4) A banda G (CA VI) diminui significativamente com o exercício, mas há uma tendência para interação entre o período e a prática habitual de atividade física,

ou seja, há uma tendência para a prática habitual de atividade física influenciar o efeito do exercício, sendo que é só nos desportistas que a prática de exercício tem efeito nesta banda proteica.

- 5) As bandas H (n.i.), I (n.i.) e P (cistatinas tipo S) apresentam aumentos estatisticamente significativos, pela prática de exercício físico.
- 6) As bandas F (zinco-alfa2-glicoproteína) e K (n.i.) sofrem efeito do exercício, mas desta vez dependente não só do tipo de exercício e da prática habitual, mas também do sexo. Ou seja, no caso da banda F (zinco-alfa2-glicoproteína), é nas mulheres desportistas que o HIIT provoca uma diminuição nos níveis de expressão desta banda. No caso da banda K (n.i.), observa-se efeito apenas por parte do HIIT, mas o qual é diferente entre homens e mulheres. No caso das mulheres o HIIT diminui os níveis de expressão desta banda enquanto que nos homens este tipo de exercício tende a aumentá-los.

De modo a resumir as variações acima referidas, na Tabela 4.5 encontram-se as bandas proteicas para as quais se observam variações, nos níveis de expressão, induzidas pelo exercício e as condições em que essas variações se observam.

Ana Roque  
Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

*Tabela 4.5 - Bandas proteicas que sofrem variações induzidas pelo exercício físico*

Bandas Proteicas (% vol)		Efeito do exercício								p-value					
		Desportistas				Sedentários				Per (antes vs depois)	Per* EF	Per* Hab	Per*EF* Hab	Per*EF* Sexo	Per*EF* Hab*Sexo
		Mulheres		Homens		Mulheres		Homens							
		HIIT	MICT	HIIT	MICT	HIIT	MICT	HIIT	MICT						
B	Ant	7,89±0,78	6,86±0,78	6,79±0,67	6,42±0,67	5,11±0,54	<b>6,74±0,54<sup>A</sup></b>	6,40±0,57	6,29±0,57	<b>0,020*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,048*</b>	>0,05
	Dep	6,56±0,66	6,58±0,66	6,11±0,57	6,53±0,57	5,22±0,46	<b>5,37±0,46<sup>B</sup></b>	6,17±0,49	6,32±0,49						
B1	Ant	2,01±0,44	2,06±0,44	<b>0,93±0,38<sup>A</sup></b>	1,32±0,38	0,97±0,27	1,10±0,27	1,36±0,31	1,09±0,31	<b>0,003*</b>	>0,05	<b>0,031*</b>	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	1,08±0,24	1,30±0,24	<b>0,71±0,21<sup>B</sup></b>	0,83±0,21	0,92±0,29	0,64±0,29	1,48±0,33	1,09±0,33						
C	Ant	8,32±1,75	9,95±1,75	12,60±1,52	<b>10,05±1,52<sup>A</sup></b>	5,17±1,28	<b>6,59±1,28<sup>A</sup></b>	8,92±1,36	7,14±1,36	<b>0,0005*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	6,50±1,57	7,94±1,57	9,99±1,36	<b>7,57±1,36<sup>B</sup></b>	5,28±0,89	<b>5,25±0,89<sup>B</sup></b>	7,13±0,94	6,40±0,94						
D	Ant	16,22±1,08	17,71±1,08	16,74±0,94	16,29±0,94	17,26±0,93	17,39±0,93	14,91±0,99	16,64±0,99	<b>0,025*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	15,41±1,16	16,46±1,16	15,50±1,01	14,13±1,01	17,40±0,97	16,19±0,97	15,80±1,03	14,38±1,03						
E	Ant	9,98±1,98	14,36±1,98	13,62±1,72	13,07±1,72	20,09±2,03	<b>12,73±2,03<sup>A</sup></b>	12,34±2,15	13,82±2,15	0,052	>0,05	>0,05	<b>0,009*</b>	>0,05	>0,05
	Dep	14,32±2,09	14,24±2,09	14,61±1,81	11,77±1,81	18,36±2,14	<b>17,10±2,14<sup>B</sup></b>	13,91±2,27	14,52±2,27						
E1	Ant	1,68±0,57	2,26±0,57	1,67±0,49	1,55±0,49	1,89±0,37	0,95±0,37	<b>1,61±0,39<sup>B</sup></b>	1,35±0,39	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,003*</b>	>0,05	>0,05
	Dep	1,81±0,47	1,39±0,47	1,96±0,40	1,60±0,40	0,90±0,21	1,10±0,21	<b>0,97±0,23<sup>A</sup></b>	1,53±0,23						
E2	Ant	0,95±0,26	0,41±0,26	0,35±0,22	0,30±0,22	0,46±0,06	0,24±0,06	0,33±0,06	0,31±0,06	>0,05	<b>0,045*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	0,36±0,06	0,42±0,06	0,35±0,05	0,32±0,05	0,39±0,05	0,32±0,05	0,31±0,05	0,38±0,05						
F	Ant	<b>2,69±0,32<sup>A</sup></b>	1,46±0,32	1,87±0,27	1,70±0,27	1,67±0,15	2,08±0,15	1,51±0,16	1,50±0,16	<b>0,001*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,028*</b>	<b>0,009*</b>
	Dep	<b>1,45±0,20<sup>B</sup></b>	1,43±0,20	1,65±0,17	1,62±0,17	1,65±0,16	1,83±0,16	1,24±0,17	1,50±0,17						
G	Ant	<b>1,95±0,18</b>	1,57±0,18	1,58±0,16	1,76±0,16	2,00±0,36	2,08±0,36	2,28±0,38	1,97±0,38	<b>0,031*</b>	>0,05	>0,05	<b>0,079</b>	>0,05	>0,05
	Dep	<b>1,47±0,21</b>	1,43±0,21	1,49±0,18	1,44±0,18	1,86±0,35	2,15±0,35	2,22±0,38	1,99±0,38						
H	Ant	1,50±0,33	1,94±0,33	1,85±0,29	1,96±0,29	2,30±0,44	1,56±0,44	2,30±0,46	3,27±0,46	<b>0,034*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Ana Roque  
Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

	Dep	2,22±0,35	2,51±0,35	2,03±0,30	1,74±0,30	2,74±0,49	2,20±0,49	2,97±0,46	2,81±0,52						
I	Ant	0,44±0,23	1,18±0,23	0,79±0,20	0,88±0,20	0,74±0,49	0,56±0,49	2,12±0,52	2,14±0,52	<b>0,032*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	0,84±0,30	1,37±0,30	0,97±0,26	0,94±0,26	1,14±0,54	1,36±0,54	2,16±0,57	2,51±0,57						
J	Ant	1,47±0,23	<b>1,35±0,23</b>	1,20±0,20	<b>1,38±0,20</b>	1,33±0,19	1,76±0,19	1,00±0,20	1,17±0,20	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,025*</b>	>0,05	>0,05
	Dep	1,09±0,30	<b>1,87±0,30</b>	1,42±0,26	<b>1,80±0,26</b>	1,36±0,18	1,29±0,18	1,05±0,19	1,08±0,19						
K	Ant	<b>4,45±0,66<sup>A</sup></b>	3,75±0,66	<b>4,64±0,57</b>	5,65±0,57	3,60±0,54	4,88±0,54	4,35±0,57	3,76±0,57	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,016*</b>
	Dep	<b>3,77±0,56<sup>B</sup></b>	4,10±0,56	<b>5,47±0,49</b>	5,37±0,49	3,27±0,52	4,66±0,52	3,88±0,55	4,29±0,55						
L	Ant	11,33±1,05	<b>9,49±1,05<sup>A</sup></b>	10,07±0,91	10,67±0,91	8,60±0,87	11,82±0,87	9,82±0,93	9,69±0,93	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,021*</b>	>0,05	>0,05
	Dep	9,76±1,21	<b>11,75±1,21<sup>B</sup></b>	9,77±1,05	12,17±1,05	8,67±1,12	9,67±1,12	9,11±1,19	9,12±1,19						
N	Ant	2,54±0,50	<b>1,78±0,50<sup>A</sup></b>	1,66±0,44	2,12±0,44	1,86±0,40	2,55±0,40	1,91±0,43	1,94±0,43	>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,033*</b>	>0,05	>0,05
	Dep	2,67±0,46	<b>2,35±0,46<sup>B</sup></b>	1,42±0,40	2,64±0,40	2,11±0,38	2,03±0,38	2,40±0,40	2,28±0,40						
P	Ant	13,75±2,12	11,28±2,12	12,51±1,84	11,26±1,84	11,64±1,16	11,75±1,16	13,74±1,23	13,73±1,23	<b>0,041*</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	Dep	17,81±1,75	11,55±1,75	12,41±1,51	14,57±1,51	12,92±1,51	11,32±1,51	15,35±1,60	13,00±1,60						
<p>Per (antes vs depois) - Período (antes vs depois); Per*EF – Período*Exercício físico; Per*Hab – Período*Prática habitual de exercício físico; Per*EF*Hab – Período*Exercício físico*Prática habitual de exercício físico; Per*EF*sexo – Período*Exercício físico*Sexo; Per*EF*Hab*Sexo – Período*Exercício físico* Prática habitual de exercício físico*Sexo; Negrito – pares entre os quais as diferenças são estatisticamente significativas; Cinzento – grupos de valores para os quais há tendência para variação entre antes e depois do exercício, mesmo que não seja estatisticamente significativa.</p>															

#### **4.5. Relação entre parâmetros salivares e sensibilidade gustativa**

Tendo em conta que foram observados efeitos do exercício na sensibilidade gustativa e no perfil proteico salivar, coloca-se a hipótese destas alterações estarem associadas entre si, ou seja, das alterações salivares poderem levar a alterações na sensibilidade gustativa. De modo a testar esta hipótese, foi avaliada a existência de correlação entre as sensibilidades para os gostos doce e amargo e cada um dos parâmetros salivares.

Através de testes de correlação, é possível observar que variações na banda G (CA VI) se correlacionam moderadamente com variações na sensibilidade para o paladar doce ( $R=-0,329$ ,  $P=0,01$ ;  $N=61$ ). A correlação é negativa, sugerindo que diminuições nos níveis de CA VI (proteína presente nesta banda) se associam a um aumento na sensibilidade para este paladar. Quando olhamos separadamente para esta relação em homens e mulheres, é apenas nas mulheres que a mesma se observa ( $R=-0,404$ ;  $P=0,027$ ;  $N=30$ ).

No caso do paladar amargo, observa-se correlação fraca entre a variação da banda B2 (n.i.) e a variação na sensibilidade para este paladar ( $R=0,263$ ;  $P=0,047$ ;  $N=58$ ).

#### **4.6. Resultados da eletroforese bidimensional**

Tendo em conta a possibilidade de separar as proteínas através de duas das suas propriedades (massa e carga), através de eletroforese bidimensional, esta abordagem foi usada para comparar os 2 tipos de exercício, em termos de efeitos no proteoma salivar.

A separação foi feita em pools de amostras apenas de homens desportistas (dadas as limitações em termos de volume e a exigência da técnica) e a análise estatística (considerando cada pool como unidade) consistiu num teste 2-way ANOVA, para medidas independentes, considerando o período (antes e depois) e o nível de intensidade (alta e moderada) da atividade, como fatores. Apesar dos pools constituídos para a saliva recolhida antes e depois do exercício terem usado os mesmos indivíduos, optou-se por

não se aplicar um teste 2-way ANOVA para amostras repetidas, pelo facto de não sendo amostras individuais poder levar a erros.

Foram obtidos perfis que permitiram emparelhar um total de 94 spots (Figura 4.4), usados na análise estatística.

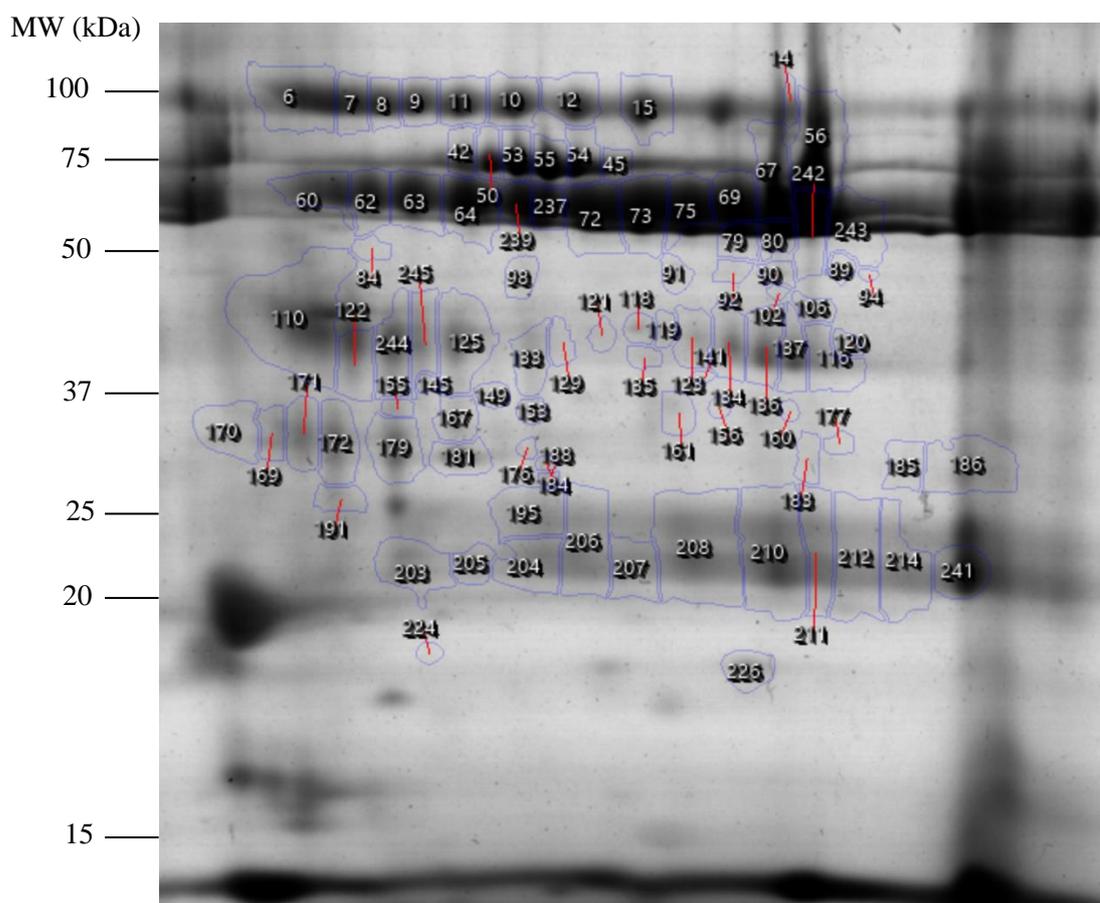


Figura 4.4 - Imagem representativa do perfil 2DE obtido para as amostras de saliva. Os números representam os spots proteicos emparelhados e considerados para análise.

No caso dos spots 89 ( $P=0,005$ ) e 134 ( $P=0,03$ ), foram observadas alterações estatisticamente significativas, induzidas pelo exercício, no sentido de diminuição nos níveis de expressão destas proteínas (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Variações no perfil salivar 2DE (Valores de volume normalizado) com o exercício

Spot	Antes <sup>#</sup>	Após <sup>#</sup>	p-value
------	--------------------	-------------------	---------

Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

89	$165,4 \cdot 10^4 \pm 37,7 \cdot 10^4$	$37,4 \cdot 10^4 \pm 33,7 \cdot 10^4$	0,023
134	$557,3 \cdot 10^4 \pm 40,5 \cdot 10^4$	$400,4 \cdot 10^4 \pm 36,2 \cdot 10^4$	0,011

# - os valores representam a média +/- erro padrão do volume normalizado dos spots proteicos.

Ao avaliar a existência de interação entre as variáveis independentes, período e nível de intensidade do exercício, é possível observar que há efeitos distintos, para alguns spots proteicos, consoante o tipo de exercício. Há 7 spots proteicos para os quais a interação entre período e intensidade do exercício é significativa ( $P < 0,05$ ). São eles os spots 55, 67, 69, 106, 116, 134 e 135. Nestes casos, vê-se um aumento (ou tendência para aumento), com o HIIT nos casos dos spots 55, 67 e 69, que não se observa no caso do MICT (Figura 4.5).

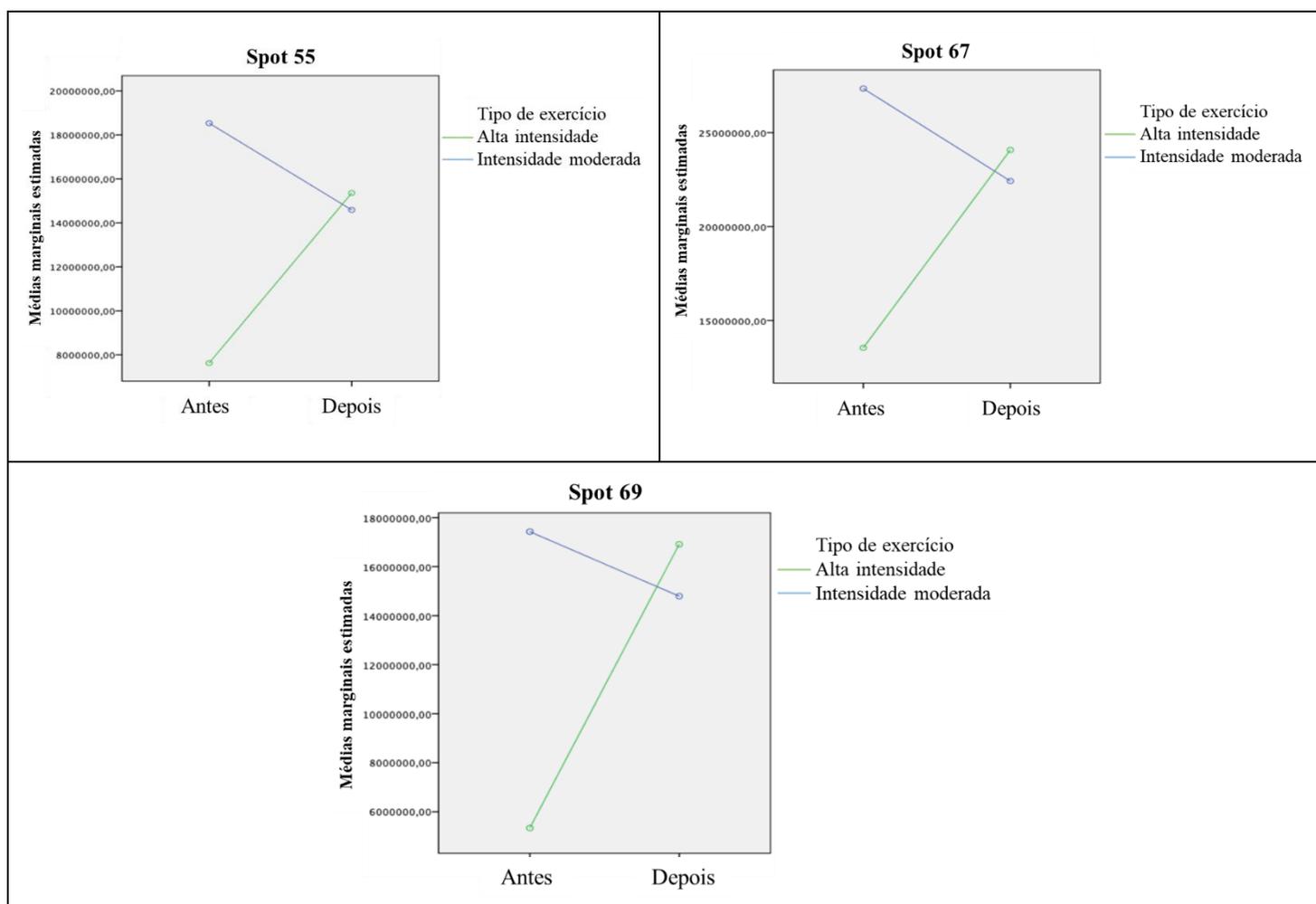


Figura 4.5 - Spots proteicos aumentados apenas pelo exercício de alta intensidade.

Já os spots 106, 116, 134 e 135 diminuem (ou tendem a diminuir) com o HIIT, não se observando estas diferenças nos casos do MICT (Figura 4.6).

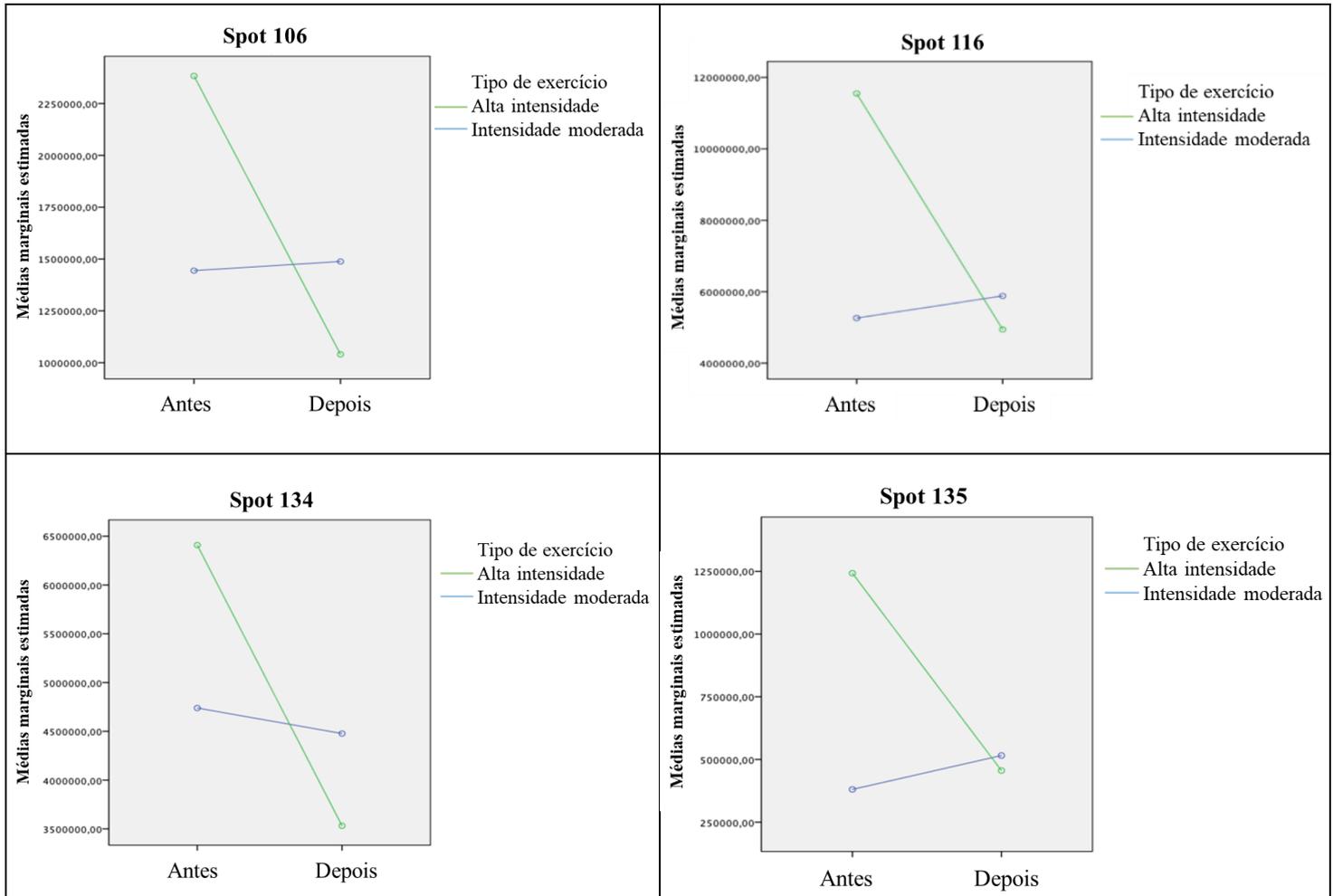


Figura 4.6 - Spots proteicos diminuídos apenas pelo exercício de alta intensidade.

Apesar de, no presente trabalho, os spots proteicos não terem sido submetidos a identificação de proteínas, por espectrometria de massa, com base em identificações desses spots, feitas por outros autores, é possível considerar as identificações apresentadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Identificações dos spots proteicos em que se observou efeito do exercício (com base em identificações apresentadas noutros estudos)

Spot	Identificação	Estudo onde foi obtida a identificação
55	Albumina	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2019)
67	$\alpha$ -amílase salivar	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2019)
69	$\alpha$ -amílase salivar	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2019)
89	$\alpha$ -amílase salivar	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2017)
106	Não identificada	n/a
116	Anidrase carbónica VI	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2017)
134	Anidrase carbónica VI	(Jessie <i>et al.</i> , 2010; Rodrigues <i>et al.</i> , 2017)
135	Não identificada	n/a

Desta forma, o HIIT induziu aumentos nos níveis de formas de albumina e alfa-amílase e diminuições nos níveis de CA VI.

## **Capítulo V – Discussão de resultados**

## 5. Discussão de resultados

Este trabalho teve como objetivo avaliar quais são as alterações induzidas pelo exercício físico na composição bioquímica da saliva e na percepção gustativa. Para isso, testou-se indivíduos com prática regular de exercício e indivíduos sedentários submetidos a 2 tipos de exercício, que variaram entre si no que diz respeito à intensidade (HIIT e MICT). Observou-se que a intensidade percebida do gosto doce sofreu um aumento significativo após a prática de exercício, independentemente do tipo de exercício, prática habitual ou sexo. Ou seja, a sensibilidade para o gosto doce aumentou com a prática de exercício. Ao olhar mais detalhadamente para os dados, foi possível observar que este efeito do exercício na sensibilidade gustativa não é independente das características das pessoas (desportistas ou sedentárias), nem do tipo de exercício que se está a considerar. Ou seja, nos indivíduos desportistas, é o MICT aquele que aumenta a intensidade percebida de doce e, nos indivíduos sedentários, é o HIIT que tende a aumentar essa sensibilidade.

De um modo geral, os nossos resultados vão de encontro a outros estudos (Ali *et al.*, 2011; Gauthier *et al.*, 2020) onde também foi observado que o exercício físico aumenta a intensidade percebida do gosto doce. Em alguns trabalhos (Crystal *et al.*, 1995; Feeney *et al.*, 2019) observaram-se diferenças na sensibilidade ao doce entre desportistas e sedentários, sem a aplicação de um protocolo de exercício, sendo que, os desportistas apresentaram uma maior sensibilidade ao doce relativamente a sedentários. Assim, pode dizer-se que a prática de exercício a longo prazo (notório nos indivíduos desportistas) aumenta a sensibilidade ao gosto doce. Estes resultados são interessantes quando comparados com os obtidos no presente estudo, uma vez que, após a prática de exercício, houve um aumento na sensibilidade ao doce para os desportistas e sedentários, logo, após a prática aguda (a curto prazo) de exercício já se observam aumentos na sensibilidade para este gosto.

É interessante ver que indivíduos desportistas são mais afetados (em termos de sensibilidade ao doce) em resposta a um tipo de exercício (MICT), enquanto que os sedentários respondem mais a outro (HIIT). Apesar de não termos encontrado estudos onde as variações na sensibilidade gustativa em resposta a diferentes intensidades de

exercício tenham sido comparadas entre indivíduos com diferentes níveis de prática habitual de atividade física, é possível pensar que não seja necessário um exercício demasiado vigoroso para se conseguir este aumento na sensibilidade gustativa. Ou seja, uma determinada velocidade/inclinação de passadeira (como o protocolo usado neste estudo) leva um indivíduo sedentário a atingir mais rapidamente a frequência cardíaca necessária para atingir o que foi considerado “alta intensidade”, enquanto que, com o mesmo tempo, velocidade e inclinação, corresponde a uma frequência cardíaca associada a um exercício moderado para um indivíduo desportista, que tem maior resistência.

Se compararmos a sensibilidade para o gosto doce, no período *baseline* (antes do exercício), entre desportistas e sedentários, não encontramos diferenças estatisticamente significativas. No entanto, o estudo de Crystal e colaboradores (Crystal *et al.*, 1995), refere diferenças na sensibilidade para este gosto em mulheres com prática habitual de exercício: o grupo de mulheres nadadoras e as mulheres que se exercitavam mais que 3 horas por semana, relataram uma maior sensibilidade para o gosto doce relativamente ao grupo controlo (mais sedentário). O mesmo foi observado por Feeney e a sua equipa, relatando-se uma maior intensidade percebida de doce por parte de homens mais ativos, relativamente a homens sedentários (Feeney *et al.*, 2019). Ali e os seus colaboradores notaram um aumento na intensidade de doce em homens durante a prática de um exercício de corrida, comparativamente a antes e após o exercício, sendo que, a sensibilidade ao doce aumentou com o aumento da duração do exercício (Ali *et al.*, 2011). No estudo de Narukawa *et al.* (2009), observou-se também uma tendência para um aumento da sensibilidade à sacarose durante a fadiga física após uma prova de meia maratona.

O significado que esta alteração tem, em termos de comportamento/escolhas alimentares pode ser pensado em termos de ingestão de alimentos mais ricos no estímulo doce. Há estudos que mostram que após a prática de exercício físico há uma maior preferência pelo gosto doce e uma maior aceitação de alimentos açucarados, enquanto que essa preferência de gosto diminui em situações quotidianas (Wan *et al.*, 2018). O balanço energético e a diminuição geral de glicogénio podem influenciar a preferência, a sensibilidade e a intensidade do gosto doce após o exercício, considerando os efeitos desses fatores nas escolhas alimentares e na nutrição geral (Wan *et al.*, 2018).

O gosto doce sinaliza a presença de carboidratos, que o corpo precisa de quebrar, armazenar sob a forma de glicogénio e mobilizar para energia durante a prática de

exercício físico (Jarry, 2016). No entanto, as reservas de carboidratos no fígado e nos músculos são limitadas, pelo que é previsível que a sua diminuição através do exercício possa desencadear um comportamento que favoreça a ingestão compensatória (Jarry, 2016), podendo refletir-se numa maior sensibilidade ao gosto doce (Narukawa *et al.*, 2009).

Para o gosto amargo, observou-se uma interação entre o período e o tipo de exercício. Após a realização do HIIT observou-se uma evolução no sentido de um aumento da sensibilidade ao gosto amargo, enquanto que, após o MICT se observou uma tendência para diminuição dessa sensibilidade (não chegando a ser estatisticamente significativo). Esta tendência para alteração da sensibilidade para o gosto amargo, com o exercício, vem no sentido de um outro estudo, onde se observou que homens obesos e não-obesos, após 2h numa bicicleta ergométrica a 60% da carga máxima individual ( $W_{máx}$ ) aumentaram a intensidade percebida de uma solução amarga (solução de sulfato de quinina a 25 mg/L) (Westerterp-plantenga *et al.*, 1997). No entanto, os diferentes estudos não são consensuais.

No estudo de Feeney *et al.* (2019), comparando homens ativos e inativos, não se observaram diferenças na sensibilidade ao gosto amargo. Neste estudo demonstrou-se ainda que a fome está associada, de forma positiva, à intensidade percebida do gosto amargo para uma alta concentração deste gosto. Ou seja, mais fome corresponde a maior intensidade percebida de amargo.

Um aspeto curioso é que o MICT aumenta a sensibilidade para o doce e parece tender a diminuir a sensibilidade para o amargo. Tendo em conta que maior sensibilidade para o doce pode potenciar a aceitação de alimentos mais saudáveis (com menores níveis de açúcares) e uma menor sensibilidade para o gosto amargo também (Louro *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020), é possível colocar a hipótese de que exercício moderado possa permitir uma maior aceitação de alimentos mais saudáveis, com menores teores em açúcar. Esta hipótese terá que ser testada em trabalhos futuros.

No que diz respeito ao efeito do exercício na saliva, observaram-se alterações, em diferentes parâmetros. No caso da taxa de secreção, esta não sofreu alterações significativas, apesar de alguns estudos anteriores referirem diminuição na taxa de secreção após a prática de exercício (Chicharro *et al.*, 1998; Mulic *et al.*, 2012; Walsh *et*

*al.*, 2004). Esta diminuição do fluxo salivar pode ser explicada pelo aumento da atividade simpática durante a prática de exercício (Mulic *et al.*, 2012), uma vez que a inervação simpática causa vasoconstrição acentuada nas arteríolas que suprem as glândulas salivares, resultando num menor volume salivar (Chicharro *et al.*, 1998; Mulic *et al.*, 2012).

Já no que diz respeito à concentração em proteína total, esta aumentou significativamente, o que vai de encontro a trabalhos que mostram que após a prática de um exercício aeróbico de intensidade moderada e de um exercício de alta intensidade (de 10 min de corrida cada) houve um aumento na concentração de proteína, sendo esse aumento maior após o exercício mais intenso (Ligtenberg *et al.*, 2015). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, como é o caso de Walsh e a sua equipa que observaram também um aumento na concentração proteica total após a combinação de um exercício numa bicicleta ergométrica (durante 10 min a uma intensidade de 60% VO<sub>2</sub> máx) com stress induzido por calor (Walsh *et al.*, 2004). Bortolini e os colaboradores, após a prática de um exercício numa bicicleta ergométrica acima do limiar anaeróbico, constataram também um aumento acentuado na concentração de proteína total (Bortolini *et al.*, 2009). O mesmo resultado ocorreu durante uma competição de pentatlo naval, onde se observou um aumento na concentração de proteína após os testes executados pelos atletas em esforço máximo ou quase máximo (Sant'Anna *et al.*, 2019). Durante o exercício, os níveis de proteína total podem estar aumentados, uma vez que a secreção de saliva é evocada principalmente pela ação de mediadores adrenérgicos. Como já foi referido anteriormente neste trabalho, o exercício é conhecido por aumentar a atividade simpática, sendo que o alto teor proteico salivar após o exercício pode ser devido ao aumento da atividade  $\beta$ -adrenérgica nas glândulas salivares (Chicharro *et al.*, 1998).

Em termos de perfil proteico, o mesmo também sofreu alterações com a prática de exercício. Outros estudos anteriores tinham já observado algumas alterações no proteoma salivar, induzidas por exercício, mas não tinham olhado simultaneamente para efeitos de exercícios diferentes e para a possibilidade de pessoas com hábitos de atividade física diferente também responderem de forma diferente. No que diz respeito aos níveis de proteínas salivares, ainda que tenham sido várias as alterações, houve alterações significativas nalgumas das proteínas mais representativas da secreção proveniente das glândulas salivares (sintetizadas por estas) como é o caso da amílase, CA VI e cistatinas.

A amilase é uma proteína que, para além da função de degradação de amido, tem sido bastante estudada na saliva pelo seu potencial de representar uma maior ativação do ramo simpático do sistema nervoso autónomo (Contreras-Aguilar *et al.*, 2021; Rutherford-Markwick *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2019). No caso do exercício, esta proteína já tinha sido referida como aumentando em resposta a exercício. Numa revisão feita por Ntovas *et al.* (2022), foi referido um aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase em homens com prática regular de exercício após a execução de um exercício de ciclismo de 2h num cicloergómetro com uma intensidade de 60% do VO<sub>2</sub> máx (intensidade moderada) (Yasuda *et al.*, 2021). Noutro estudo contemplado na revisão de Ntovas *et al.* (2022) também se constatou um aumento na concentração da  $\alpha$ -amilase em homens desportistas tal como em sedentários após um exercício de ciclismo com uma intensidade de 70% da carga máxima individual (intensidade moderada a elevada) (Wunsch *et al.*, 2019). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes aos referidos, como é o caso de Weiss e os colaboradores que observaram um aumento na amilase em resposta a 20 min de exercício intenso numa bicicleta ergométrica em homens e mulheres (Weiss *et al.*, 2019).

É curioso que só a nível da forma de menor massa molecular (forma nativa) desta proteína é que se observaram aumentos com o exercício, tendo-se observado também aumento da atividade enzimática. A presença de diferentes proteoformas de amilase na saliva é já conhecida (Contreras-Aguilar *et al.*, 2019, 2021), apesar de não estar bem conhecido de que forma é que as mesmas variam em termos de função. No presente trabalho observou-se uma diminuição da forma glicosilada de amilase após a prática de exercício e um aumento da concentração e atividade da forma não glicosilada (forma nativa). Foram encontrados resultados semelhantes num estudo (Contreras-Aguilar *et al.*, 2021) que revelou alterações de menor magnitude, ou seja, pouca variação por parte da forma glicosilada da amilase, comparativamente à forma não glicosilada que sofreu aumentos na sua atividade em resposta a um agente de stress/estímulo físico (treino de crossFit) e psicológico. Estas alterações de menor magnitude da forma glicosilada após uma situação de stress podem dever-se à ativação da secreção salivar de  $\alpha$ -amilase salivar pelas células das glândulas salivares. Isso pode levar a uma diminuição da sua glicosilação no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi que é realizado previamente para armazenamento dessa enzima nas vesículas das células acinares (Wang

*et al.*, 2014). No entanto, este diferente efeito do exercício, nas diferentes formas, poderá associar-se a efeitos específicos a nível de cavidade oral.

A sensibilidade para o gosto doce tinha já sido associada aos níveis de amilase salivar (Rodrigues *et al.*, 2017) e, por isso, poderia ser de esperar que aumentos na amilase salivar significassem diminuição na sensibilidade ao doce. No entanto, neste trabalho isso não se observou, assim como também não se observou correlação entre a amilase e a sensibilidade gustativa. Mais estudos terão que ser feitos no futuro para esclarecer o papel das diferentes proteoformas desta proteína, assim como a relação exata da amilase com o gosto doce.

Relativamente à CA VI, observou-se uma diminuição dos seus níveis após a prática de exercício físico, sendo que, os perfis SDS-PAGE revelaram estar dependente da prática habitual de exercício, tendo-se notado uma diminuição com o exercício em desportistas. A CA VI faz parte dum grupo de enzimas, as anidrases carbónicas (CAs), que estão entre as enzimas conhecidas que atuam mais rapidamente e participam de uma gama notável de processos fisiológicos, como ácido-base e equilíbrio de fluidos, calcificação, fotossíntese, respiração, metabolismo e crescimento celular. Existem 15 isoformas de  $\alpha$ -CAs que são caracterizadas em humanos e, entre elas está a CA VI, uma isoenzima produzida pelas células acinares serosas nas PG e SMG e nas glândulas mamárias humanas resultando em secreção na saliva e no leite humano, respetivamente (Yrjänäinen *et al.*, 2022). A CA VI é uma metaloenzima de zinco que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono a bicarbonato ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). Ao catalisar esta reação, acredita-se que a CA VI forneça uma maior capacidade de tamponamento para as secreções (Kimoto *et al.*, 2006). Esta enzima é também conhecida como gustina e está envolvida na manutenção das células gustativas (Barbarossa *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019), estando associada à capacidade de degustação do composto amargo PROP (Cabras *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014).

Abordando a relação entre os parâmetros salivares e a sensibilidade gustativa foi possível constatar no presente trabalho que variações na banda G (CA VI) se correlacionaram moderadamente (correlação negativa) com variações na sensibilidade para o paladar doce (apenas nas mulheres). Este resultado é consistente com outros trabalhos (Rodrigues *et al.*, 2017) que mostram que a CA VI apresentou níveis de

expressão mais elevados na saliva de indivíduos pouco sensíveis ao gosto doce. Embora a sua função ainda não tenha sido completamente elucidada, a proteína salivar CA VI tem sido relatada como um fator trófico no crescimento e desenvolvimento das papilas gustativas, sendo que, deficiências nesta proteína têm sido associadas à diminuição da percepção gustativa (Rodrigues *et al.*, 2017). Assim, seria de esperar que níveis mais altos de CA VI fossem observados em indivíduos sensíveis, em vez de indivíduos pouco sensíveis. No entanto, a relação dessa proteína com a sensibilidade gustativa não é consensual, havendo alguns autores que referem não haver associação entre os seus níveis e a percepção gustativa (Feeney & Hayes, 2014).

No que diz respeito às proteínas mais representativas da secreção salivar, houve ainda alterações significativas nos níveis de cistatinas. No presente trabalho, as cistatinas, mais especificamente, as cistatinas tipo S, sofreram um aumento após a prática de exercício. As cistatinas são um grupo de inibidores fisiológicos das proteases de cisteína (ou cisteína proteinases) cuja principal função na saliva é proteger a cavidade oral (Dickinson *et al.*, 2002; Ganeshnarayan *et al.*, 2012; Henskens *et al.*, 1994). Estes inibidores atuam protegendo os tecidos do hospedeiro da proteólise destrutiva de proteases de cisteína de origem viral, bacteriana e do próprio hospedeiro (ex: papaína, catepsinas lisossômicas e catepsina B, H e L) (Ganeshnarayan *et al.*, 2012). As cistatinas constituem uma superfamília de proteínas, podendo ser classificadas em 3 subfamílias: as cistatinas da família 1 (estefinas A e B), as cistatinas da família 2 (S, SA, SN e C) e as cistatinas da família 3 (cininogénios). As maiores atividades de cistatina foram encontradas na saliva submandibular, enquanto que apenas pequenas quantidades estão presentes na saliva parótida (Henskens *et al.*, 1994). As cistatinas C são produzidas em vários órgãos diferentes, por outro lado, as cistatinas tipo S são expressas principalmente nas glândulas salivares, em particular nas SMG (Sant'Anna *et al.*, 2019).

Para além da função referida anteriormente, as cistatinas do tipo S têm também sido associadas à percepção oral, nomeadamente, à percepção do gosto amargo (Morzel *et al.*, 2014). Um aumento nestas proteínas está associado a uma maior aceitação de amargo em bebés (Morzel *et al.*, 2014) e, noutro estudo, observou-se que adultos hipersensíveis ao gosto amargo da cafeína tinham menores níveis de cistatinas SN (Dsamou *et al.*, 2012).

Relativamente ao efeito do exercício físico nos níveis de cistatinas, foi encontrado um estudo que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho. No estudo de Sant'Anna *et al.* (2019), após a prática de vários exercícios extenuantes por parte de atletas durante uma competição de pentatlo naval, observou-se um claro aumento dos níveis de cistatinas, em particular nas cistatinas C e S. Os exercícios consistiram numa corrida de obstáculos, corrida de natação utilitária, corrida aeróbica em passadeira, sprints anaeróbicos e exercício aeróbico incremental num cicloergómetro. Tanto os exercícios aeróbicos como anaeróbicos realizados numa intensidade máxima ou quase máxima levaram a um aumento da presença de ambas as cistatinas (S e C) na saliva, assim, pode-se dizer que as cistatinas S e C são moduladas pelo exercício. Num outro estudo obtiveram-se resultados semelhantes, sendo que, após a prática de um exercício intervalado de baixa intensidade numa passadeira, observou-se um aumento nos níveis de cistatinas em saliva estimulada (Ventura *et al.*, 2022).

Quanto às outras proteínas identificadas no presente trabalho e em que se observaram algumas alterações, como albumina, recetor polimérico de imunoglobulinas, zinco-alfa2-glicoproteína, cadeia de imunoglobulinas e PIP, há menos estudos que permitam compreender o porquê das variações observadas, dificultando assim conclusões relativamente à relação entre as mesmas e o exercício.

O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. Não foi possível, com base em identificações feitas em estudos anteriores, a identificação de algumas proteínas presentes nalguns spots proteicos, observados como estando alterados em resposta ao exercício físico ou relacionados com percepção oral do gosto doce e amargo. Então, seria de interesse, futuramente, identificar estas proteínas de modo a compreender melhor o efeito do exercício no proteoma salivar.

A análise através de eletroforese bidimensional, apenas foi realizada a amostras com pools de indivíduos, apenas a homens desportistas, devido ao tempo necessário para executar esta técnica e da potencial influência hormonal, no caso das mulheres, que poderia interferir nos resultados. Deste modo, não se consegue, através dos resultados obtidos ter tanta informação como a obtida através de SDS-PAGE, já que trabalhando com *pools*, perde-se informação a nível individual.

Para além das limitações que foram referidas, há ainda a acrescentar mais algumas limitações neste estudo. Nomeadamente, as dificuldades no recrutamento de participantes para o estudo devido às especificidades do mesmo, por requerer pessoas com prática regular de exercício, pelo tempo necessário para completar os protocolos de exercício, recolhas de saliva e avaliação da sensibilidade gustativa e devido a ter sido realizado em plena pandemia de COVID-19. O período de recolha de amostras demorou mais alguns meses do que estava previsto devido à dificuldade em encontrar participantes para o estudo e de inúmeras desmarcações e desistências por parte dos participantes. O comprometimento ou a falta dele pelos participantes do estudo pode ser uma limitação, já que não é possível saber se as tarefas pedidas para realizar em casa foram feitas de acordo com o estipulado, podendo levar a um enviesamento dos dados, mas partimos do princípio que as tarefas foram realizadas de acordo com o previsto.

Por fim, estava inicialmente prevista a análise de um questionário de frequência alimentar, que acabou por não se realizar por ir além dos objetivos deste trabalho. Seria interessante relacionar, em trabalhos futuros, o referido questionário com o exercício físico e a percepção gustativa dos participantes, de modo a perceber como é que os hábitos alimentares podem influenciar o proteoma salivar, antes e após a prática de exercício e ver se existem diferenças significativas entre desportistas e sedentários.

## **Capítulo VI – Conclusão**

## 6. Conclusão

O presente trabalho foi importante para compreender o efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição bioquímica da saliva. Os resultados obtidos parecem demonstrar que a prática de exercício físico de diferentes intensidades produz resultados diferentes ao nível da percepção gustativa de doce e amargo e no proteoma salivar de indivíduos desportistas e sedentários.

A sensibilidade para o gosto doce sofreu alterações evidentes com a prática de exercício. Após a prática de exercício houve um aumento significativo na intensidade percebida de doce. Quanto à sensibilidade para o amargo, houve tendências diferentes com os diferentes exercícios, não chegando as alterações a ser significativas.

Para além disso, observou-se que a concentração proteica da saliva aumentou com a prática de exercício. A forma nativa da amilase sofreu aumentos, mais evidente nas mulheres sedentárias, após o MICT e, no caso dos desportistas, aumentou em resposta ao HIIT, podendo dizer-se que esta proteína é modulada de forma diferente de acordo com a intensidade do exercício e a prática habitual dos indivíduos. Relativamente a outras proteínas salivares, a CA VI diminuiu significativamente com o exercício, sendo que, só nos desportistas é que a prática de exercício teve efeito nesta banda proteica. Contrariamente, as cistatinas S sofreram aumentos após a prática de exercício físico.

É de realçar que foi ainda possível encontrar uma relação entre os parâmetros salivares e a sensibilidade gustativa. Variações nos níveis de CA VI estiveram associadas (correlação negativa) a variações na sensibilidade para o doce, sendo que, diminuições nos níveis de CA VI se associaram a aumentos na sensibilidade para este paladar, notório no caso das mulheres.

No futuro, será interessante identificar as proteínas que sofreram alterações com o exercício físico e que não foram identificadas, para melhor compreender as alterações observadas no presente trabalho. Será também de interesse investigar a sensibilidade gustativa de outros gostos como o salgado, ácido e umami em desportistas e sedentários e se a sensibilidade a estes gostos se modifica com a prática de exercícios de diferentes intensidades e se está relacionada aos níveis de alguma proteína salivar específica. Por

fim, será ainda importante, futuramente, tentar relacionar o padrão alimentar dos desportistas e sedentários de modo a perceber se poderá influenciar a resposta destes após a prática de exercício e a sua relação com a sensibilidade gustativa.

## **Referências bibliográficas**

## Referências bibliográficas

- Ali, A., Duizer, L., Foster, K., Grigor, J., & Wei, W. (2011). Changes in sensory perception of sports drinks when consumed pre, during and post exercise. *Physiology and Behavior, 102*(5), 437–443.
- Barbarossa, I. T., Melis, M., Mattes, M. Z., Calò, C., Muroi, P., Crnjar, R., & Tepper, B. J. (2015). The gustin (CA6) gene polymorphism, rs2274333 (A/G), is associated with fungiform papilla density, whereas PROP bitterness is mostly due to TAS2R38 in an ethnically-mixed population. *Physiology and Behavior, 138*, 6–12.
- Beaulieu, K., Hopkins, M., Blundell, J., & Finlayson, G. (2016). Does Habitual Physical Activity Increase the Sensitivity of the Appetite Control System? A Systematic Review. In *Sports Medicine* (Vol. 46, Issue 12, pp. 1897–1919). Springer International Publishing.
- Beaulieu, K., Hopkins, M., Blundell, J., & Finlayson, G. (2017). Impact of physical activity level and dietary fat content on passive overconsumption of energy in non-obese adults. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity, 14*(1).
- Blundell, J. E. (2011). Physical activity and appetite control: can we close the energy gap? *Nutrition Bulletin, 36*, 356–366.
- Bortolini, M. S., de Agostini, G. G., Reis, I. T., Lamounier, R. P. M. S., Blumberg, J. B., & Espindola, F. S. (2009). Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. *Research Quarterly for Exercise and Sport, 80*(3), 604–610.
- 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).
- Breslin, P. A. S. (2013). An Evolutionary Perspective on Food and Human Taste. *Current Biology, 23*(9), R409–R418.

- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151–159). Academic Press Inc.
- Buttar, K. K., Saboo, N., & kacker, S. (2019). A review: Maximal oxygen uptake (VO<sub>2</sub> max) and its estimation methods. ~ 24 ~ *International Journal of Physical Education, Sports and Health*, 6(6).
- 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).
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276.
- 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).
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. In *Nature* (Vol. 444, Issue 7117, pp. 288–294). Nature Publishing Group.
- Chicharro, J. L., Lucía, A., Pérez, M., Vaquero, A. F., & Ureña, R. (1998). Saliva Composition and Exercise. *Sports Med*, 26 (1): 17-27.
- Contreras-Aguilar, M. D., Mateo, S. V., Tecles, F., Hirtz, C., Escribano, D., & Cerón, J. J. (2021). Changes occurring on the activity of salivary alpha-amylase proteoforms in two naturalistic situations using a spectrophotometric assay. *Biology*, 10(3).
- Contreras-Aguilar, M. D., Vialaret, J., Deville de Périère, D., Escribano, D., Lehmann, S., Tecles, F., Cerón, J. J., & Hirtz, C. (2019). Variation of human salivary alpha-amylase proteoforms in three stimulation models. *Clinical Oral Investigations*, 24(1), 475–486.
- Crystal, S., Frye, C. A., & Kanarek, R. B. (1995). Taste Preferences and Sensory Perceptions in Female Varsity Swimmers. In *Appetite* (Vol. 24).

- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. In *Archives of Oral Biology* (Vol. 60, Issue 6, pp. 863–874). Elsevier Ltd.
- Dawes, C., & Wong, D. T. W. (2019). Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *Journal of Dental Research*, 98(2), 133–141.
- 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, 1–11.
- de Araujo, V. R., Lisboa, P., Boaventura, G., Caraméz, F., Pires, L., Oliveira, E., Moura, E., & Casimiro-Lopes, G. (2018). Acute high-intensity exercise test in soccer athletes affects salivary biochemical markers. *Free Radical Research*, 52(8), 850–855.
- De Pero, R., Minganti, C., Cibelli, G., Cortis, C., & Piacentini, M. F. (2021). The stress of competing: Cortisol and amylase response to training and competition. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 6(1).
- de Souza, I. V., Pereira, L. C. R., Dantas, K. B. A., & Dantas, E. H. M. (2021). Salivary markers of stress and physical activities: A systematic review. In *Revista Andaluza de Medicina del Deporte* (Vol. 14, Issue 3, pp. 186–191). Centro Andaluz de Medicina del Deporte.
- Dickinson, D. P., Thiesse, M., & Hicks, M. J. (2002). Expression of Type 2 Cystatin Genes CST1-CST5 in Adult Human Tissues and the Developing Submandibular Gland. In *DNA AND CELL BIOLOGY* (Vol. 21, Issue 1).
- 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.
- Feeney, E. L., & Hayes, J. E. (2014). Exploring associations between taste perception, oral anatomy and polymorphisms in the carbonic anhydrase (gustin) gene CA6. *Physiology and Behavior*, 128, 148–154.

- Feeney, E. L., Leacy, L., O'Kelly, M., Leacy, N., Phelan, A., Crowley, L., Stynes, E., Casanove, A. de, & Horner, K. (2019). Sweet and umami taste perception differs with habitual exercise in males. *Nutrients*, *11*(1).
- Ferry, A. L. S., Mitchell, J. R., Hort, J., Hill, S. E., Taylor, A. J., Lagarrigue, S., & Vallès-Pàmies, B. (2006). In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(23), 8869–8873.
- Finkler, M., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2014). The relationship between oxidative stress and exercise. In *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 1–11). Walter de Gruyter GmbH.
- Franco-Martínez, L., González-Hernández, J. M., Horvatić, A., Guillemin, N., Cerón, J. J., Martínez-Subiela, S., Sentandreu, M. Á., Brkljačić, M., Mrljak, V., Tvarijonaviciute, A., & Jiménez Reyes, P. (2020). Differences on salivary proteome at rest and in response to an acute exercise in men and women: A pilot study. *Journal of Proteomics*, *214*.
- Ganeshnarayan, K., Velliyagounder, K., Furgang, D., & Fine, D. H. (2012). Human salivary cystatin SA exhibits antimicrobial effect against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res*.
- Gauthier, A. C., Guimarães, R. de F., Namiranian, K., Drapeau, V., & Mathieu, M. E. (2020). Effect of physical exercise on taste perceptions: A systematic review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 9, pp. 1–24). MDPI AG.
- Gottschall, J. S., Davis, J. J., Hastings, B., & Porter, H. J. (2020). Exercise time and intensity: How much is too much. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, *15*(6), 808–815.
- Granger, D. A., & Taylor, M. K. (2020). *Salivary Bioscience - Foundations of Interdisciplinary Saliva Research and Applications*.
- Gravina, S. A., Yep, G. L., & Khan, M. (2013). Human biology of taste. In *Annals of Saudi Medicine* (Vol. 33, Issue 3, pp. 217–222).

- Green, B. G., Dalton, P., Cowart, B., Shaffer, G., Rankin, K., & Higgins, J. (1996). Evaluating the 'Labeled Magnitude Scale' for Measuring Sensations of Taste and Smell. In *Chem. Senses* (Vol. 21).
- Henskens, Y., Veerman, E., Mantel, M., van der Velden, U., & Nieuw Amerongen, A. (1994). Cystatins S and C in Human Whole Saliva and in Glandular Salivas in Periodontal Health and Disease. In *J Dent Res* (Vol. 73, Issue 10).
- Holmberg, K. v., & Hoffman, M. P. (2014). Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. In *Monographs in Oral Science* (Vol. 24, pp. 1–13). S. Karger AG.
- Honceriu, C., Curpan, A. S., Ciobica, A., Ciobica, A., Trus, C., & Timofte, D. (2021). Connections between different sports and ergogenic aids—focusing on salivary cortisol and amylase. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 57, Issue 8). MDPI AG.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *THE JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY*, 85, 162–169.
- Jarry, L. C. (2016). Effects of Physical Exercise on Sensory Perception and Hedonic Response.
- Jayasinghe, S. N., Kruger, R., Walsh, D. C. I., Cao, G., Rivers, S., Richter, M., & Breier, B. H. (2017). Is sweet taste perception associated with sweet food liking and intake? *Nutrients*, 9(7).
- 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.
- Jones, E. J., Rohleder, N., & Schreier, H. M. C. (2020). Neuroendocrine coordination and youth behavior problems: A review of studies assessing sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary adrenal axis activity using salivary alpha amylase and salivary cortisol. In *Hormones and Behavior* (Vol. 122). Academic Press Inc.
- Kaufman, E., & Lamster, I. B. (2002). The Diagnostic Applications of Saliva - A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2):197-212.

- Keast, R. S., & Costanzo, A. (2015). Is fat the sixth taste primary? Evidence and implications. *Flavour journal*, 4:5.
- Kimoto, M., Kishino, M., Yura, Y., & Ogawa, Y. (2006). A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 51(2), 117–122.
- Lamy, E., Capela-Silva, F., & Tvarijonavičiute, A. (2018). Research on Saliva Secretion and Composition. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited.
- Lamy, E., Marco, M., Cristina, P., Lénia, R., Lopes, O., & Fernando, S. (2016). Oral food perception and polyphenol-rich foods acceptance-the importance of knowing individuals saliva characteristics for promoting consumption. *Journal of the International Society of Antioxidants Issue N°4*, 3.
- Leicht, C. A., Goosey-Tolfrey, V. L., & Bishop, N. C. (2018). Exercise intensity and its impact on relationships between salivary immunoglobulin A, saliva flow rate and plasma cortisol concentration. *European Journal of Applied Physiology*, 118(6), 1179–1187.
- Ligtenberg, A. J. M., Brand, H. S., Van Den Keijbus, P. A. M., & Veerman, E. C. I. (2015). The effect of physical exercise on salivary secretion of MUC5B, amylase and lysozyme. *Archives of Oral Biology*, 60(11), 1639–1644.
- Ligtenberg, A., Liem, E., Brand, H., & Veerman, E. (2016). The Effect of Exercise on Salivary Viscosity. *Diagnostics*, 6(4), 40.
- Long, S. J., Hart, K., & Morgan, L. M. (2002). The ability of habitual exercise to influence appetite and food intake in response to high- and low-energy preloads in man. *British Journal of Nutrition*, 87(5), 517–523.
- Loper, H. B., La Sala, M., Dotson, C., & Steinle, N. (2015). Taste perception, associated hormonal modulation, and nutrient intake. *Nutrition Reviews*, 73(2), 83–91.
- Lopes, C., Aro, A., Azevedo, A., Ramos, E., & Barros, H. (2007). {A figure is presented} Intake and Adipose Tissue Composition of Fatty Acids and Risk of Myocardial Infarction in a Male Portuguese Community Sample {A figure is presented}. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(2), 276–286.

- Louro, T., Simões, C., Castelo, P. M., Capela E Silva, F., Luis, H., Moreira, P., & Lamy, E. (2021). How individual variations in the perception of basic tastes and astringency relate with dietary intake and preferences for fruits and vegetables. *Foods*, *10*(8).
- Low, J. Y. Q., Lacy, K. E., McBride, R., & Keast, R. S. J. (2016). The association between sweet taste function, anthropometry, and dietary intake in adults. *Nutrients*, *8*(4).
- Martin, L. E., Kay, K. E., & Torregrossa, A. M. (2019). Bitter-Induced Salivary Proteins Increase Detection Threshold of Quinine, but Not Sucrose. *Chemical Senses*, *44*(6), 379–388.
- Martin, L. E., Nikonova, L. V., Kay, K. E., & Torregrossa, A. M. (2019). Altering salivary protein profile can increase acceptance of a novel bitter diet. *Appetite*, *136*, 8–17.
- Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1855, pp. 101–105). Humana Press Inc.
- Meleady, P. (2018). Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1664, pp. 3–14). Humana Press Inc.
- Morgan-Bathke, M., Lin, H. H., Chibly, A. M., Zhang, W., Sun, X., Chen, C. H., Flodby, P., Borok, Z., Wu, R., Arnett, D., Klein, R. R., Ann, D. K., & Limesand, K. H. (2013). Deletion of ATG5 shows a role of autophagy in salivary homeostatic control. *Journal of Dental Research*, *92*(10), 911–917.
- Morzel, M., Chabanet, C., Schwartz, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., & Nicklaus, S. (2014). Salivary protein profiles are linked to bitter taste acceptance in infants. *European Journal of Pediatrics*, *173*(5), 575–582.
- Mulic, A., Tveit, A. B., Songe, D., Sivertsen, H., & Skaare, A. B. (2012). Dental erosive wear and salivary flow rate in physically active young adults. *BMC Oral Health*, *12*(1).
- Nakagawa, M., Mizuma, K., & Inui, T. (1996). Changes in Taste Perception Following Mental or Physical Stress. In *Chem. Senses* (Vol. 21).

- Narukawa, M., ue, H., MoriTa, K., kuga, S., isaka, T., & haYashi, Y. (2009). Change in Taste Sensitivity to Sucrose Due to Physical Fatigue. In *Food Sci. Technol. Res* (Vol. 15, Issue 2).
- Ntovas, P., Loumprinis, N., Maniatakos, P., Margaritidi, L., & Rahiotis, C. (2022). The Effects of Physical Exercise on Saliva Composition: A Comprehensive Review. In *Dentistry Journal* (Vol. 10, Issue 1).
- Pacheco, V. B., Nery, G., Fernandes, L. L., Santana, T. V., Jimenez, M., Borges, L., Hatanaka, E., Braga, P., Monteiro, F. R., Amaral, J. B., Alves, L. S., Bachi, A. L. L., Da Silva, S. G., Birbrair, A., & Heller, D. (2022). Salivary Proteome, Inflammatory, and NETosis Biomarkers in Older Adult Practitioners and Nonpractitioners of Physical Exercise. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. In *SALIVARY GLANDS AND SALIVA Number* (Vol. 5).
- Proctor, G. B., & Carpenter, G. H. (2014). Salivary secretion: Mechanism and neural regulation. *Monographs in Oral Science*, 24, 14–29.
- Roblegg, E., Coughran, A., & Sirjani, D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 142, pp. 133–141). Elsevier B.V.
- 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).
- Rodrigues, L., Espanca, R., Costa, A. R., Antunes, C. M., Pomar, C., Capela-Silva, F., Pinheiro, C. C., Domingues, P., Amado, F., & Lamy, E. (2019). Comparison of salivary proteome of children with different sensitivities for bitter and sweet tastes: association with body mass index. *International Journal of Obesity*, 43(4), 701–712.
- Rodrigues, L., Silverio, R., Costa, A. R., Antunes, C., Pomar, C., Infante, P., Conceição, C., Amado, F., & Lamy, E. (2020). Taste sensitivity and lifestyle are associated with food preferences and BMI in children. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(7), 875–883.

- Roy, M., Williams, S. M., Brown, R. C., Meredith-Jones, K. A., Osborne, H., Jospe, M., & Taylor, R. W. (2018). High-Intensity Interval Training in the Real World: Outcomes from a 12-Month Intervention in Overweight Adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *50*(9), 1818–1826.
- Rutherford-Markwick, K., Starck, C., Dulson, D. K., & Ali, A. (2017). Salivary diagnostic markers in males and females during rest and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *14*(1).
- Sant’Anna, M. D. L., Oliveira, L. T., Gomes, D. V., Marques, S. T. F., Provance, D. W., Sorenson, M. M., & Salerno, V. P. (2019). Physical exercise stimulates salivary secretion of cystatins. *PLoS ONE*, *14*(10).
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2020). Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 11). MDPI AG.
- Soares, S., García-Estévez, I., Ferrer-Galego, R., Brás, N. F., Brandão, E., Silva, M., Teixeira, N., Fonseca, F., Sousa, S. F., Ferreira-da-Silva, F., Mateus, N., & de Freitas, V. (2018). Study of human salivary proline-rich proteins interaction with food tannins. *Food Chemistry*, *243*, 175–185.
- Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2012). Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Research International*, *49*(2), 807–813.
- Stolle, T., Grondinger, F., Dunkel, A., Meng, C., Médard, G., Kuster, B., & Hofmann, T. (2017). Salivary Proteome Patterns Affecting Human Salt Taste Sensitivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(42), 9275–9286.
- Strahler, J., Skoluda, N., Kappert, M. B., & Nater, U. M. (2017). Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 83, pp. 657–677). Elsevier Ltd.
- Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., López-Jornet, P., & Lamy, E. (2020). Saliva in Health and Disease - The Present and Future of a Unique Sample for Diagnosis.
- Ventura, T. M. O., Santos, K. O., Braga, A. S., Thomassian, L. T. G., Buzalaf, M. A. R., Barbieri, F. A., Kalva-Filho, C. A., Faria, M. H., & Magalhães, A. C. (2022).

Salivary proteomic profile of young adults before and after the practice of interval exercise: preliminary results. *Sport Sciences for Health*, 18(3), 983–997.

Viana, R. B., Naves, J. P. A., Coswig, V. S., De Lira, C. A. B., Steele, J., Fisher, J. P., & Gentil, P. (2019). Is interval training the magic bullet for fat loss? A systematic review and meta-analysis comparing moderate-intensity continuous training with high-intensity interval training (HIIT). In *British Journal of Sports Medicine* (Vol. 53, Issue 10, pp. 655–664). BMJ Publishing Group.

Vidanage, D., Wasalathanthri, S., & Hettiarachchi, P. (2022). Long-term combined exercises enhance sweet taste sensitivity and reduce carbohydrate intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Asian Journal of Medical Sciences*, 13(2), 54–60.

Walsh, N. P., Montague, J. C., Callow, N., & Rowlands, A. V. (2004). Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Archives of Oral Biology*, 49(2), 149–154.

Wan, H.-Y., Stickford, J. L., Dawkins, E. J., Lindeman, A. K., & Stager, J. M. (2018). Acute modulation in dietary behavior following glycogen depletion and post-exercise supplementation in trained cyclists. In *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*

Wang, Y. C., Peterson, S. E., & Loring, J. F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. In *Cell Research* (Vol. 24, Issue 2, pp. 143–160).

Wardhani, N. L. P. A., Irmawati, A., & Sunariani, J. (2011). Changes of the sweet taste sensitivity due to aerobic physical exercise. *Dental Journal (Maj. Ked. Gigi)*, Vol. 44. No. 1 March 2011: 35–38.

Watanabe, S., Komine, O., Endo, F., Wakasugi, K., & Yamanaka, K. (2018). Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, 145(1), 80–89.

Weiss, L. R., Venezia, A. C., & Smith, J. C. (2019). A single bout of hard RPE-based cycling exercise increases salivary alpha-amylase. *Physiology and Behavior*, 208.

- Westerterp-plantenga, M. S., T Verwegen, C. R., W Ijedema, M. J., G Wijckmans, N. E., M Saris, W. H., T Verwegen, C. R., W Ijedema, M. J., G Wijckmans, N. E., & M Saris, W. H. (1997). Acute Effects of Exercise or Sauna on Appetite in Obese and Nonobese Men. In *Physiology & Behavior* (Vol. 62, Issue 6).
- Wewege, M., van den Berg, R., Ward, R. E., & Keech, A. (2017). The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. In *Obesity Reviews* (Vol. 18, Issue 6, pp. 635–646). Blackwell Publishing Ltd.
- Williams, N. (2017). The Borg Rating of Perceived Exertion (RPE) scale. In *Occupational Medicine* (Vol. 67, Issue 5, pp. 404–405). Oxford University Press.
- Wood, G., Murrell, A., Van Der Touw, T., & Smart, N. (2019). HIIT is not superior to MICT in altering blood lipids: A systematic review and meta-analysis. In *BMJ Open Sport and Exercise Medicine* (Vol. 5, Issue 1). BMJ Publishing Group.
- Wunsch, K., Wurst, R., von Dawans, B., Strahler, J., Kasten, N., & Fuchs, R. (2019). Habitual and acute exercise effects on salivary biomarkers in response to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, *106*, 216–225.
- Yasuda, N., Yamamoto, K., & Iwashita, N. (2021). Concurrent evaluation of salivary and urinary  $\alpha$ -amylase activity following prolonged exercise with or without carbohydrate solution in aerobically active men. *Neuroendocrinol Lett*, *42*(4), 265–276.
- 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*.

## **Anexos**

## Anexos

### Anexo A - Declaração de consentimento informado utilizado no estudo.



#### Declaração de consentimento informado

Estudo: Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva

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 do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva". A sua participação consiste na resposta a um questionário de frequência alimentar, um questionário sobre dados demográficos, a testagem de percepção do sabor doce e amargo, a recolha de saliva, em condições de não estimulação, para posterior avaliação, em laboratório, da composição proteica.

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

Se desejar esclarecer alguma dúvida ou saber mais detalhes do projeto, pode contactar Elsa Lamy (investigadora responsável pelo estudo): [ecsl@uevora.pt](mailto: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 B** - Questionário de dados pessoais e padrão alimentar.



UNIVERSIDADE  
DE ÉVORA

CÓDIGO \_\_\_\_\_

**Questionário**

Por favor, responda às seguintes questões.

Idade:

Sexo:

Indique o seu peso aproximado, em kg:

Indique a sua altura aproximada:

É fumador? Se sim, quantos cigarros fuma por dia?

Tomou alguma medicação nos últimos 3 dias? Se sim, qual?

Possui alguma limitação transitória ou permanente de paladar ou olfato (e.g., constipação)?

Como descreveria o seu padrão alimentar atual?

- a) Omnívoro (inclui carne, peixe, ovos e laticínios)
- b) Pescetariano (exclui carne, pode incluir peixe, ovos e/ou laticínios)
- c) Flexitariano (Dieta predominantemente de base vegetal, pode incluir consumo esporádico de carne ou peixe)
- d) Ovo-lacto-vegetariano (Exclui carne e peixe, pode incluir ovos e laticínios)
- e) Vegano (Dieta exclusivamente de base vegetal)

Indique em que medida sente fome neste momento, utilizando a escala abaixo.

1									9
Nenhuma	2	3	4	5	6	7	8		Muita
fome									fome
<input type="radio"/>									

Indique em que medida sente sede neste momento, utilizando a escala abaixo.

1									9
Nenhuma	2	3	4	5	6	7	8		Muita
sede									sede
<input type="radio"/>									

---

Participação no estudo "Efeito do exercício físico na percepção gustativa e na composição da saliva"

**Anexo C** - Avaliação da sensibilidade gustativa.



CÓDIGO \_\_\_\_\_

**Sensibilidade gustativa**

Prove cada tira gustativa pela ordem indicada e registre na escala a intensidade da resposta ao estímulo (colocando o número da tira)

