

# Estudo do efeito de polissacarídeos na interação entre proteínas salivares e polifenóis: relação entre atividade-estrutura

Bárbara de Barros Monteiro

Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território

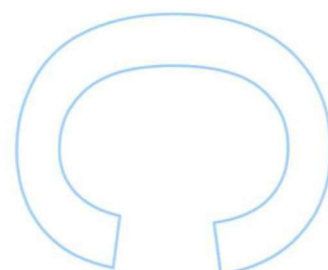
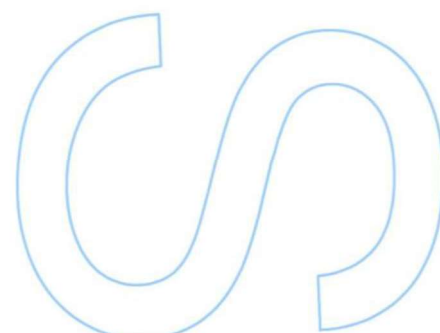
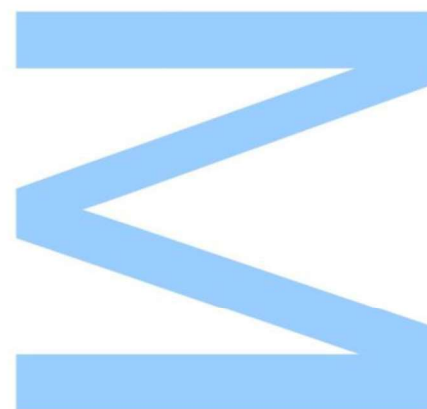
2021

**Orientador**

Doutor Vítor Freitas, Professor Catedrático, FCUP

**Coorientador**

Doutora Susana Soares, Investigadora Auxiliar, REQUIMTE/LAQV



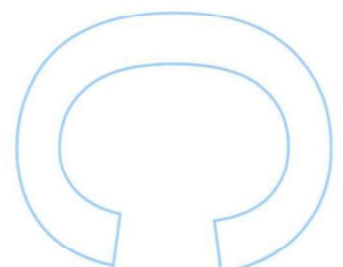
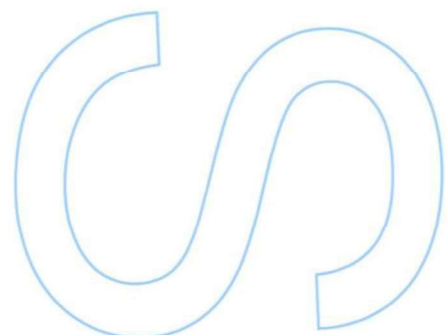
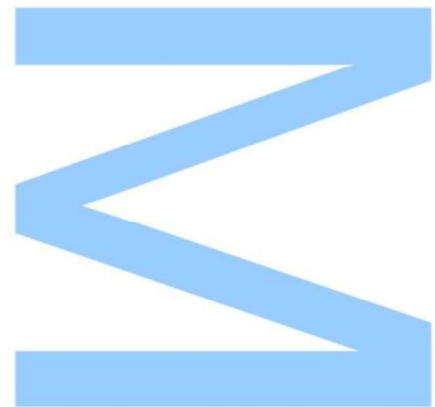




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, 15 / 01 / 2022





## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as instituições e pessoas que permitiram a realização deste trabalho, nomeadamente ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP).

Ao meu orientador, o Professor Doutor Victor de Freitas, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho e por todo o apoio e dedicação para que tudo seguisse da melhor forma.

À minha coorientadora, Professora Doutora Susana Soares, e por toda a disponibilidade e acompanhamento ao longo de todo o tempo. Pela sua persistência em resolver os problemas que apareceram e ensinamentos das mais diversas áreas.

A todos aqueles que conviveram comigo dentro laboratório e me ajudaram a ultrapassar obstáculos ao longo deste ano. Obrigada, Elsa, Mónica, Carlos, Ana Luísa, Hélder, Joana Azevedo, Joana Oliveira, Luís, Natércia, Paulinha, Rita, Ricardo, Rosa, Sofia, Telmo, Vânia, Patrícia e Alexandra.

À minha família por todo o apoio e motivação em seguir os meus objetivos. E por me aturarem nos dias em que estava mais stressada.

Por fim, ao José Carlos, pelo carinho e compreensão, e por ter estado sempre lá nos momentos mais difíceis. Pelas horas passadas a ouvir me falar sem sentido e os diversos conselhos que me ajudaram muito.



## Resumo

Os compostos fenólicos, nomeadamente os taninos, são compostos muito estudados devido às suas propriedades distintas de interagir com outras moléculas como as proteínas salivares, estando na origem da sensação de adstringência e amargor. A adstringência apresenta um papel importante na aceitabilidade dos produtos alimentares pelos consumidores, não sendo muito apreciada pela maioria destes. Em contrapartida, existem alimentos que são aceites exatamente pela presença equilibrada desta sensação de secura, como é o caso de chás e vinhos tintos.

Sabendo que os polissacarídeos possuem a capacidade de afetar a ligação dos taninos com as proteínas salivares e assim diminuir a adstringência, o objetivo deste trabalho foi obter polissacarídeos com diferentes estruturas e atividades a partir de subprodutos alimentares, como a casca da banana, de forma a conhecer como estes poderão modular a adstringência e o amargor.

Este trabalho foi dividido em três partes: obtenção e caracterização de compostos fenólicos de diversas matrizes alimentares, nomeadamente chá verde, brócolo, extrato de grainha e ácido tânico; isolamento de polissacarídeos da casca da banana; estudo das interações entre estes compostos e as proteínas salivares. Para o isolamento de compostos fenólicos a partir do brócolo e do chá verde recorreu-se a extrações sólido-líquido e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a análise das proteínas salivares foi realizado um tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) à saliva obtida utilizando-se HPLC para obtenção do perfil de proteínas. Para a obtenção de polissacarídeos da casca da banana utilizou-se extrações sólido-líquido com diferentes tempos de extração e temperaturas.

As interações entre estes compostos foram realizadas segundo tempos controlados e analisadas por eletroforese e HPLC. Verificou-se que os compostos fenólicos de todas as matrizes estudadas interagem com saliva humana, sendo o extrato de chá verde e o ácido tânico os que mais apresentam precipitação de proteínas salivares. Os compostos fenólicos responsáveis por essa precipitação nestes dois extratos, estão reconhecidos como sendo adstringentes, o que pode comprometer a aceitação do consumidor.

Segundo a análise por eletroforese verifica-se que os polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole são capazes de impedir a precipitação das proteínas salivares, princípio que está na base da adstringência, sendo este último o mais eficiente. A

utilização deste subproduto na modulação da adstringência abre portas para projetos futuros como o ensaio sensorial para melhor compreensão da sua aplicação prática.

### **Palavras-chave**

Proteínas salivares, taninos, polissacarídeos, adstringência.



## Abstract

Phenolic compounds, specifically tannins, are highly studied due to their distinctive properties of interaction with other molecules such as salivary proteins causing the sensation of astringency and bitterness. Astringency plays an important role in the acceptability of food products by consumers not being much appreciated by most of them. On the other hand, there are foods that are accepted exactly because of the balanced presence feeling of this sensation of dryness, as is the case of teas and red wines.

Knowing that polysaccharides have the ability to affect tannin bonds with salivary proteins and, therefore decrease astringency, the aim of this work is to obtain polysaccharides with different structures and activities from food by-products, in order to know how they can modulate astringency and bitterness.

This work was divided into three parts: obtaining and characterization of phenolic compounds from different food matrices, namely green tea, broccoli, seed extract and tannic acid; isolation of polysaccharides from banana peel; study of the interactions between these compounds and salivary proteins. For the isolation of phenolic compounds from broccoli and green tea, solid-liquid extractions and high efficiency liquid chromatography (HPLC) were used. For the analysis of salivary proteins, a treatment with trifluoroacetic acid (TFA) was performed on the saliva obtained using HPLC to obtain the protein profile. To obtain polysaccharides from the banana peel, were used solid-liquid extractions with different extraction times and temperatures.

The interactions between these compounds were performed according to controlled times and analyzed by electrophoresis and HPLC. It was verified that the phenolic compounds of all studied matrices interact with human saliva, being green tea extract and tannic acid the ones with the highest precipitation of salivary proteins. The phenolic compounds responsible for this precipitation in these two extracts are recognized as being astringent, which can compromise consumer acceptance.

According to the analysis by electrophoresis, it is verified that the polysaccharides extracted with water for 16 hours and imidazole are capable of preventing the precipitation of salivary proteins, a principle that underlies astringency, being this the most efficient. The use of this by-product in the modulation of astringency opens doors for future projects such as sensory testing for a better understanding of its practical application.

**Keywords**

Salivary proteins, tannins, polysaccharides, astringency.

# Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1. Adstringência.....	1
1.2. Interação proteínas salivares-compostos fenólicos.....	1
1.2.1. Fatores que influenciam as interações.....	2
1.2.1.1. Efeito da estrutura dos taninos.....	2
1.2.1.2. Efeito da estrutura das proteínas salivares.....	3
1.2.1.3. Efeito de outros fatores (pH, força iónica, etanol, temperatura).....	4
1.3. Saliva e proteínas salivares.....	5
1.3.1. Saliva humana.....	5
1.3.2. Proteínas salivares.....	5
1.3.2.1. Estaterinas.....	6
1.3.2.2. Cistatinas.....	6
1.3.2.3. Péptido P-B.....	6
1.3.2.4. Proteínas ricas em prolina (PRP).....	7
1.4. Compostos fenólicos e principais classes.....	7
1.4.1. Compostos não flavonóides.....	8
1.4.2. Compostos flavonóides.....	9
1.4.3. Taninos.....	10
1.4.3.1. Taninos condensados.....	11
1.4.3.2. Taninos hidrolisáveis.....	11
1.4.4. Importância dos compostos fenólicos na alimentação e na saúde.....	12
1.4.4.1. Chá verde.....	13
1.4.4.2. Ácido tânico.....	14
1.4.4.2.1. Pentagalhoil-glucose (PGG).....	14
1.4.4.3. Brócolo.....	15
1.5. Propriedades organolépticas.....	16
1.5.1. Modulação da adstringência e amargor.....	16

1.6. Polissacarídeos.....	16
1.6.1. Interação polissacarídeos-taninos-proteínas salivares .....	17
1.6.2. Polissacarídeos da casca de banana.....	17
2. Objetivos .....	19
3. Material e métodos.....	20
3.1. Extração de compostos fenólicos .....	20
3.1.1. Chá verde .....	20
3.1.2. Brócolo .....	21
3.2. Hemi-síntese de compostos galhoilados .....	22
3.2.1. Pentagalhoil-glucose (PGG).....	22
3.2.2. Outros derivados de galhoil-glucose .....	22
3.3. Extração de polissacarídeos da casca de banana.....	23
3.4. Isolamento de saliva e proteínas salivares.....	24
3.5. Interação entre compostos fenólicos, proteínas salivares e polissacarídeos. 24	
3.5.1. SDS-PAGE .....	25
3.5.2. Análise por HPLC .....	26
3.6. Análise sensorial de infusões de chá verde.....	26
3.7. Análise estatística.....	27
4. Resultados e discussão.....	28
4.1. Caracterização dos extratos de compostos fenólicos .....	28
4.1.1. Chá verde .....	28
4.1.2. Brócolo .....	29
4.1.3. Grainha.....	35
4.1.4. Ácido tânico.....	37
4.2. Caracterização de compostos galhoilados obtidos por hemi-síntese.....	38
4.3. Extração de polissacarídeos da casca da banana.....	41
4.4. Interação de compostos fenólicos, proteínas salivares e polissacarídeos.....	42
4.4.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos a utilizar.....	43
4.4.2. Efeito dos polissacarídeos na interação proteínas salivares-compostos fenólicos <sup>45</sup>	
4.4.3. Efeito dos polissacarídeos na interação das proteínas salivares com uma matriz alimentar .....	48
4.5. Proteínas salivares que interagiram com os compostos fenólicos.....	49
4.5.1. Identificação de proteínas salivares .....	49

4.5.2. Identificação das famílias de proteínas salivares precipitadas pela interação com os extratos .....	50
4.6. Compostos fenólicos que interagem com as proteínas salivares .....	54
4.7. Análise sensorial dos efeitos dos polissacarídeos numa infusão de chá verde	57
4.8. Importância dos compostos fenólicos na alimentação .....	58
5. Conclusão .....	61
6. Referências bibliográficas .....	62
Anexos .....	76

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura de dímeros de procianidinas. Adaptado de de Freitas e Mateus (2001). .....	3
<b>Figura 2.</b> Estruturas dos compostos não flavonóides. Adaptado de Soares, Brandão et al. (2020). .....	8
<b>Figura 3.</b> Núcleo flavânico dos compostos flavonóides. Adaptado de Kang, Lee, Otieno e Ha (2018). .....	9
<b>Figura 4.</b> Estruturas dos compostos flavonóides. Adaptado de Kang, Lee et al. (2018). .....	10
<b>Figura 5.</b> Principais classes de compostos fenólicos. ....	11
<b>Figura 6.</b> Estrutura da pentagalhoil-glucose (PGG). Adaptado de Li, Shaik et al. (2011). .....	15
<b>Figura 7.</b> Cromatograma obtido por HPLC do extrato de chá verde detetado a 280 nm. GC – galhocatequina; EGC – epigalhocatequina; C – catequina; EGCG – epigalhocatequina galhato; B2g – dímero de procianidinas; EGCG3”Me – epigalhocatequina-3-O-galhato; Q – quercetina; ECG – epicatequina galhato; K – kaempferol e ECG3”Me – epicatequina-3-O-galhato. ....	28
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas obtidos por HPLC da fração 1 (A) e das frações 2 a 9 (B) do extrato de brócolo, no comprimento de onda de 280 nm. ....	30
<b>Figura 9.</b> Especto de massa de LC-MS do extrato de brócolo. ....	31
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas do extrato de brócolo na concentração de 1,0 g/L detetado a 280 nm (A), 320 nm (B), 360 nm (C) e 520 nm (D). A numeração corresponde à numeração atribuída aos compostos na Tabela 2 que foram possíveis de identificar. ....	35
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de extrato de grainha de concentração 0,7 g/L detetado a 280 nm. B1 a B4 – dímeros de procianidina; EEC – trímero de procianidina de epicatequina-epicatequina-catequina; EC – epicatequina; C1 – trímero de procianidina C1. ....	36
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de ácido tânico de concentração 0,8 g/L detetado a 280 nm. ....	37
<b>Figura 13.</b> Metanólise do ácido tânico dando origem a PGG e metil galhato. Adaptado de Chen e Hagerman (2004). ....	38
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtido por HPLC da reação de hemi-síntese de PGG de 15h após liofilização e diluída em 5% de dimetilsulfóxido. ....	39

- Figura 15.** Cromatogramas obtidos por HPLC das soluções 1, 3 e 6 respetivamente. Sendo que o pico 1 corresponde a compostos menos galhoilados, o pico 2 corresponde à PGG e o pico 3 corresponde a compostos mais galhoilados..... 40
- Figura 16.** SDS-PAGE da interação de diferentes concentrações de extrato de brócolo (1-4), extrato de chá verde (5-8), extrato de grainha (9-12) e ácido tânico (13-16) com saliva. Sc corresponde a saliva controlo. .... 43
- Figura 17.** SDS-PAGE da interação de saliva com extrato de grainha (1-6), ácido tânico (7-12), extrato de chá verde (13-18) e extrato de brócolo (19-24) na ausência e presença de polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole. Sc corresponde a saliva controlo, Ext. G é a interação de saliva com extrato de grainha de concentração 0,5 g/L, AT é a interação de saliva com ácido tânico de concentração 0,1 g/L, Ext. CV é a interação de saliva com extrato de chá verde de concentração 0,4 g/L e Ext. B é a interação de saliva com extrato de brócolo de concentração 1,0 g/L. .... 46
- Figura 18.** SDS-PAGE da interação de polissacarídeos extraídos com carbonato de sódio 16h e 2h com extrato de grainha (1-6), ácido tânico (7-12), extrato de chá verde (13-18) e extrato de brócolo (19-24) e saliva. Sc corresponde a saliva controlo, Ext. G é a interação de saliva com extrato de grainha de concentração 0,5 g/L, AT é a interação de saliva com ácido tânico de concentração 0,1 g/L, Ext. CV é a interação de saliva com extrato de chá verde de concentração 0,4 g/L e Ext. B é a interação de saliva com extrato de brócolo de concentração 1,0 g/L..... 47
- Figura 19.** SDS-PAGE da interação de polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole com infusão de chá verde com diferentes tempos de incubação (2, 5 e 10 min) e saliva. Sc corresponde a saliva controlo. .... 48
- Figura 20.** Cromatograma de controlo de saliva humana detetado a 214 nm, com identificação das principais famílias de proteínas salivares..... 49
- Figura 21.** Representação gráfica da concentração de proteínas salivares que interagiram com extrato de brócolo, extrato de chá verde, extrato de grainha e ácido tânico em concentrações crescentes. Os dados foram normalizados para a concentração do controlo. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogéneos. .... 50
- Figura 22.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC das diferentes famílias de proteínas salivares que interagiram com extrato de brócolo, de chá verde e de grainha e com ácido tânico nas diferentes concentrações. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem da saliva controlo. Os dados apresentados

correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogéneos..... 51

**Figura 23.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC das diferentes famílias de proteínas salivares que interagiram com infusão de chá verde com tempos de incubação de 2, 5 e 10 min. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem da saliva controlo. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogéneos..... 53

**Figura 24.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC dos diferentes compostos fenólicos precipitados de extrato de brócolo, de chá verde e de grainha e ácido tânico após interação com saliva humana, nas diferentes concentrações. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem inicial de cada concentração. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos não-significativamente diferentes ( $p < 0.5$ )..... 55



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de chá verde. Adaptado de Soares, Soares et al. (2020). Rt - tempo de retenção. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de brócolo. A identificação foi feita com base em literatura e/ou nos padrões de fragmentação. Rt – tempo de retenção. ....	31
<b>Tabela 3.</b> Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de grainha. Adaptado de Soares, Brandão et al. (2019). Rt - tempo de retenção. ....	36
<b>Tabela 4.</b> Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de ácido tânico. Adaptado de Guerreiro, Brandão et al. (2021). Rt - tempo de retenção. ....	37
<b>Tabela 5.</b> Registo das alterações efetuadas no método de Chen e Hagerman (2004) para hemisíntese de PGG e resultados obtidos. ....	39
<b>Tabela 6.</b> Registo das áreas das diferentes soluções e razão entre elas. ....	41
<b>Tabela 7.</b> Pesos e rendimentos de cada fração de polissacarídeos obtida. ....	41
<b>Tabela 8.</b> Novos pesos e rendimentos de cada fração de polissacarídeos obtida por uma segunda extração. ....	42
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos no teste triangular de duas infusões de chá verde, com e sem polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole. ....	58
<b>Tabela 10.</b> Caracterizados dos compostos fenólicos mais precipitados de cada fração, ao nível de adstringência e amargor. ....	59

## Lista de abreviaturas

AIR – *Alcohol Insoluble Residue* (resíduo insolúvel em álcool)

B2g – Procianidina dimérica B2 3-O-galhato

B4 – Procianidina dimérica B4

aPRPs – *Acidic Proline Rich Proteins* (proteínas ricas em prolina ácidas)

bPRPs – *Basic Proline Rich Proteins* (proteínas ricas em prolina básicas)

ECG – Epicatequina galhato

EGCG – Epigalhocatequina galhato

gPRPs – *Glycosylated Proline Rich Proteins* (proteínas ricas em prolina glicosiladas)

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

LC-MS – *Liquid chromatography – mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa)

PGG – 1,2,3,4,6-Penta-O-galhoil-D-glucopiranoose (pentagalhoilglucose)

PRPs – *Proline Rich Proteins* (proteínas ricas em prolina)

Rg II – Ramnogalacturano II

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)

SEM – *Standard Error of the Mean* (desvio padrão da média)

TFA – *Trifluoroacetic acid* (ácido trifluoroacético)

VC – Volume de coluna

# 1. Introdução

## 1.1. Adstringência

Adstringência é uma palavra derivada do Latim, *ad stringere*, que significa ligar, apertar (Pires, Pastrana, Fuciños, Abreu, & Oliveira, 2020). Como a própria palavra indica, esta sensação é caracterizada pelas sensações de secura, aperto, encolhimento e enrugamento da cavidade oral experimentadas durante o consumo de alimentos, especialmente frutos pouco maduros, e bebidas ricas em taninos (Bajec & Pickering, 2008; Brandão, Silva et al., 2017; Doco, Brandão et al., 2018).

A adstringência desempenha um papel importante na determinação da aceitabilidade de vários produtos alimentares pelos consumidores, destacando-se em alguns alimentos mais que outras características sensoriais como a cor e o aroma (Gibis, Thellmann, Thongkaew, & Weiss, 2014; Monteleone, Condelli, Dinnella, & Bertuccioli, 2004). Além disso, também existem alimentos que são apreciados pela presença de adstringência como é o caso dos chás, vinhos tintos e cervejas (Nascimento, Pinto, Duarte, de Sousa, & dos Santos Araújo, 2016).

A percepção da adstringência ocorre quando os taninos interagem com a cavidade oral, nomeadamente com células epiteliais, proteínas da mucosa, proteínas salivares, entre outros (Pires, Pastrana et al., 2020). Atualmente existem diversos estudos sobre este assunto mas o mecanismo mais estudado e mais aceite pela comunidade científica é a ligação dos taninos às proteínas salivares, em que se forma um complexo insolúvel que precipita e origina esta sensação (Ramos-Pineda, Carpenter, García-Estévez, & Escribano-Bailón, 2019).

Existem diversos fatores, como por exemplo a estrutura dos taninos e das proteínas, pH, temperatura e presença de outras moléculas, que afetam a interação dos taninos com as proteínas salivares e consequentemente afetam os níveis de adstringência sentidos.

## 1.2. Interação proteínas salivares-compostos fenólicos

A interação dos taninos com proteínas salivares é um tópico em crescente desenvolvimento, estando relacionada com diferentes áreas de investigação, como por

exemplo, o sabor dos alimentos e bebidas, assim como o valor nutricional dos alimentos (Gao, Ge, Cai, Zeng, & Grimes, 2008).

Esta interação ocorre através de dois tipos de interações, o efeito hidrofóbico entre os anéis fenólicos dos taninos e os resíduos de prolina das proteínas ricas em prolina (PRPs) e por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do anel fenólico B e os locais aceitadores de hidrogénio (Rinaldi & Moio, 2020). Estas últimas ligações que se formam ajudam a estabilizar a interação (Murray, Williamson, Lilley, & Haslam, 1994; Rinaldi & Moio, 2020). À medida que a concentração de taninos aumenta, estes estabelecem ligações entre diferentes moléculas de proteínas levando à dimerização (Jakobek, 2015; Soares, Brandão, Mateus, & de Freitas, 2017). Por fim, estas moléculas agregam-se acabando por precipitar (Soares, Brandão et al., 2017).

### **1.2.1. Fatores que influenciam as interações**

As interações entre os compostos fenólicos e as proteínas salivares estão dependentes de vários fatores como peso molecular e a estrutura do tanino, da estrutura/conformação e carga da proteína, da flexibilidade conformacional de ambos, das concentrações e de fatores externos, como por exemplo a presença de polissacarídeos (Adrar, Madani, & Adrar, 2019; Amoako & Awika, 2016; Nascimento, Pinto et al., 2016).

#### **1.2.1.1. Efeito da estrutura dos taninos**

O efeito da estrutura dos taninos é afetado pelo peso molecular, grau de polimerização e galhoilação, estereoquímica e conformação, assim como pela ligação carbono-carbono entre as unidades monoméricas (ligações interflavânicas) (Soares, Brandão et al., 2020).

Baxter, Lilley, Haslam e Williamson (1997) comprovaram que o aumento do grau de polimerização e do peso molecular favorece a afinidade dos taninos pelas PRPs e consequentemente aumenta a formação de complexos insolúveis que precipitam. O mesmo se verifica com o aumento do grau de galhoilação (maior número de grupos galhoil) e posição do grupo hidroxilo, que ao promoverem ligações de hidrogénio, aumentam a ligação dos compostos fenólicos às proteínas salivares (J. R. Bacon & M. J. Rhodes, 2000; Plet, Delcambre, Chaignepain, & Schmitter, 2015). Encontra-se relatado na literatura que o grau de polimerização dos taninos tem maior efeito sobre a

afinidade e a dissociação do complexo tanino-proteína salivar que o grau de galhoilação (Cala, Dufourc et al., 2012).

de Freitas e Mateus (2001) mostraram que para os flavan-3-óis, de entre as duas unidades principais, a (+)-catequina apresenta maior interação com as PRPs que a (-)-epicatequina, e as ligações interflavânicas, nomeadamente os dímeros de procianidinas C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, apresentam maior interação do que os dímeros de procianidinas C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 1).

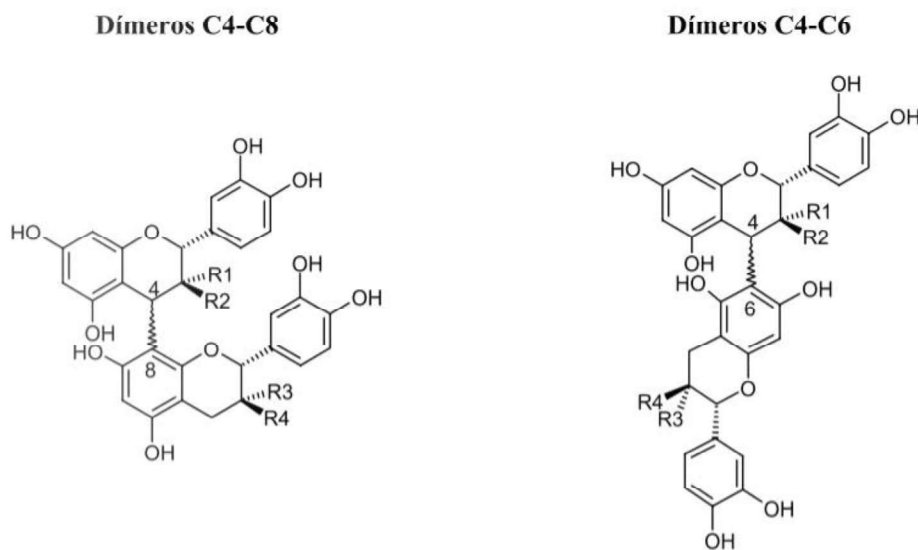


Figura 1. Estrutura de dímeros de procianidinas. Adaptado de de Freitas e Mateus (2001).

### 1.2.1.2. Efeito da estrutura das proteínas salivares

A estrutura das proteínas afeta a afinidade que certas proteínas têm para interagir com taninos. Já foi reportado por diversos estudos que a interação com os taninos é maior quando as proteínas apresentam uma conformação helicoidal mais “aberta” e aleatoriamente enrolada (de Freitas & Mateus, 2001; Delimont, Rosenkranz, Haub, & Lindshield, 2017; Green, 1993; Soares, Brandão et al., 2020).

As PRPs tendem a possuir estas características referidas, o que lhes fornecem maior afinidade de ligação com taninos do que as proteínas globulares (Amoako & Awika, 2016). Pensava-se que seriam as proteínas ricas em prolina básicas (bPRPs) as que se ligam mais efetivamente com os taninos, mas mais recentemente, foi mostrado que as interações dos taninos com as PRPs ocorre primeiro com as proteínas ricas em prolina acídicas (aPRPs), seguindo-se as proteínas ricas em prolina glicosiladas (gPRPs) e só por fim com as bPRPs (Carvalho, Mateus et al., 2006; Soares, Brandão et al., 2017).

### **1.2.1.3. Efeito de outros fatores (pH, força iónica, etanol, temperatura)**

A interação entre taninos e PRPs também pode ser afetada por outros fatores, como por exemplo, o pH, a força iónica, os solventes (nomeadamente solventes orgânicos), a temperatura e a presença de outras moléculas em solução como os polissacarídeos. O efeito destes fatores é muito variável, parecendo estarem mais dependentes do tipo de par tanino-proteína (Soares, Brandão et al., 2020).

Forino, Picariello, Rinaldi, Moio e Gambuti (2020) realizaram um estudo de como o pH afeta as características fenólicas e precipitação de proteínas salivares de vinhos, e concluíram que a interação dos taninos com as proteínas salivares é favorecida para baixos valores de pH.

Nascimento, Pinto et al. (2016) estudaram o efeito da força iónica (concentração de cloreto de sódio) na formação de complexos de tanino-proteína salivares e concluíram que, o aumento da força iónica leva a uma diminuição da formação de complexos de taninos-proteínas salivares, apesar de terem existido estudos que comprovavam o contrário (Canon, Paté et al., 2013).

McRae, Ziora, Kassara, Cooper e Smith (2015) mostrou através do estudo do efeito de diferentes concentrações de etanol nos mecanismos de interação dos taninos de um vinho modelo, que a complexação entre taninos e proteínas salivares diminui com concentrações baixas de etanol (10 e 15%).

Em relação à temperatura, Charlton, Baxter et al. (2002) demonstraram que a interação de taninos com PRPs é reduzida pelo aumento da temperatura. Por outro lado, Hofmann, Glabasnia et al. (2006) mostraram através da interação de taninos hidrolisáveis com albumina de soro bovino (BSA) que o aumento da temperatura favorece esta interação. Assim, verifica-se que não existe coerência na literatura e que este efeito encontra-se dependente do tipo de proteína e tanino (Soares, Brandão et al., 2020).

## 1.3. Saliva e proteínas salivares

### 1.3.1. Saliva humana

A saliva é constituída maioritariamente por água (99,5%), contendo também uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos que incluem eletrólitos, enzimas, proteínas, entre outros, e que variam de indivíduo para indivíduo (Al-Manei, Almotairy, Bostanci, Kumar, & Grigoriadis, 2020; Engelen, van den Keybus et al., 2007; Humphrey & Williamson, 2001). A saliva é produzida por três glândulas salivares principais: sublingual (7 a 8%), submaxilar (65%) e parótida (20%), em conjunto com outras glândulas salivares menores localizadas na cavidade oral (menos de 10%) (Gibbins & Carpenter, 2013; Humphrey & Williamson, 2001).

A saliva contribui com várias funções para a saúde da cavidade oral, podendo estas ser agrupadas em sete categorias principais: (1) lubrificação e proteção, (2) função tampão e limpeza de impurezas, (3) manutenção da integridade dos dentes, (4) homeostasia microbiana, (5) digestão e formação do bolo alimentar, (6) sabor e aroma, e (7) cicatrização de feridas (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012; Amerongen & Veerman, 2002; Carpenter, 2013; Dawes, Pedersen et al., 2015; de Paula, Teshima et al., 2017; Holmberg & Hoffman, 2014; Humphrey & Williamson, 2001).

### 1.3.2. Proteínas salivares

As proteínas salivares representam 0,3% da constituição total da saliva (Roblegg, Coughran, & Sirjani, 2019). Estes componentes salivares apresentam propriedades multifuncionais (possuem mais do que uma função), redundantes (têm funções semelhantes, mas em diferentes graus) e possuem propriedades tanto protetoras como prejudiciais dependendo da localização da molécula, como por exemplo as amílases que em solução facilitam a eliminação de bactérias da cavidade oral, mas quando adsorvidas à superfície promovem a aderência dessas bactérias levando à decomposição do esmalte (Humphrey & Williamson, 2001; Levine, 1993).

Já foram identificadas mais de 5 000 proteínas na saliva, as quais possuem várias funções biológicas e antimicrobianas que afetam a saúde da cavidade oral (Bostanci, Selevsek et al., 2018; Grassl, Kulak et al., 2016). A maioria das proteínas encontradas na saliva (90%) são originadas nas três glândulas salivares principais, enquanto que o restante (10%) advêm das glândulas menores e da microflora oral (Afacan, Öztürk, Emingil, Köse, & Bostanci, 2018; Bostanci & Belibasakis, 2018).

As proteínas salivares são agrupadas em classes tendo em conta as suas estruturas e características, sendo as mais importantes: mucinas, estaterina, histatinas, cistatinas, péptido P-B e PRPs (Castagnola, Cabras, Vitali, Sanna, & Messana, 2011; Ramos-Pineda, Carpenter et al., 2019). Este trabalho focou-se nas proteínas de baixo peso molecular que serão descritas em seguida.

### **1.3.2.1. Estaterinas**

As estaterinas são péptidos salivares produzidos normalmente pelas glândulas salivares principais, nomeadamente pela parótida e submaxilar, e que possuem um alto teor de prolina, tirosina e ácido glutâmico e várias isoformas (Helmerhorst, Traboulsi, Salih, & Oppenheim, 2010; Qamar, Rahim, Chew, & Fatima, 2016).

Estas proteínas contribuem para a proteção da dentição através do impedimento de precipitação de soluções de sais de cálcio e fosfato, como ocorre na hidroxiapatite (de Almeida, Gregio, Machado, De Lima, & Azevedo, 2008; Qamar, Rahim et al., 2016), e lubrificação dos dentes para impedimento de desgaste (Harvey, Carpenter, Proctor, & Klein, 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as estaterinas são proteínas que possuem um N-terminal ácido, podendo ser muito precipitadas por taninos (Brandão, Soares, Mateus, & de Freitas, 2014; Helmerhorst, Traboulsi et al., 2010).

### **1.3.2.2. Cistatinas**

As cistatinas são uma família de proteínas que contêm cisteína, e cujas massas moleculares variam entre 13 e 14 kDa (Humphrey & Williamson, 2001; Silva, García-Estévez et al., 2017).

Estas proteínas possuem um papel menor na regulação do cálcio presente na saliva, mas são grandes inibidores de enzimas que degradam proteínas, nomeadamente a cisteína protease, enzima envolvida na doença periodontal (Kordiš & Turk, 2009).

### **1.3.2.3. Péptido P-B**

O péptido P-B caracteriza-se por possuir um alto teor de resíduos de prolina (aproximadamente 50% da sua sequência) assim como as PRP (Messana, Cabras et al., 2004; Silva, García-Estévez et al., 2017). Este péptido apresenta elevada semelhança com as estaterinas, e devido a isso não são, geralmente, incluídos na família das PRPs apesar de ser rico em prolina (Inzitari, Cabras et al., 2006).



Além dos resíduos de prolina, os péptidos P-B também apresentam na sua estrutura vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e três resíduos de tirosina (Silva, García-Estévez et al., 2017). Em vários estudos já foi comprovado que assim como as esterinas, os péptidos P-B são altamente precipitados por taninos (Brandão, Soares et al., 2014).

#### **1.3.2.4. Proteínas ricas em prolina (PRP)**

As PRPs caracterizam-se por possuir um alto conteúdo em resíduos de prolina, podendo ser distinguidas pelo seu carácter ácido ou básico e grau de glicosilação em PRP ácidas (aPRPs), básicas (bPRPs) e glicosiladas (gPRPs) (Adrar, Madani et al., 2019; Castagnola, Cabras et al., 2011).

Estas proteínas, mais especificamente as gPRPs, têm como funções a lubrificação da cavidade oral e a interação com taninos, tendo impacto na sensação na boca após o consumo de produtos ricos nestes (Gibbins & Carpenter, 2013). Por outro lado, acredita-se que as bPRPs apresentam um papel principal no impedimento da toxicidade dos taninos de alto peso molecular (Jöbstl, O'Connell, Fairclough, & Williamson, 2004), enquanto que as aPRPs possuem um papel vinculado com o processo de mineralização dos dentes e com a modulação da colonização bacteriana destes (Castagnola, Cabras et al., 2011).

### **1.4. Compostos fenólicos e principais classes**

Os compostos fenólicos são compostos naturais que resultam do metabolismo secundário de plantas, estando presentes em hortícolas, frutas e produtos derivados, como por exemplo o vinho e o chá verde (de Moraes Arnos, da Costa, & Schmidt, 2019); Soares, Brandão et al. (2017).

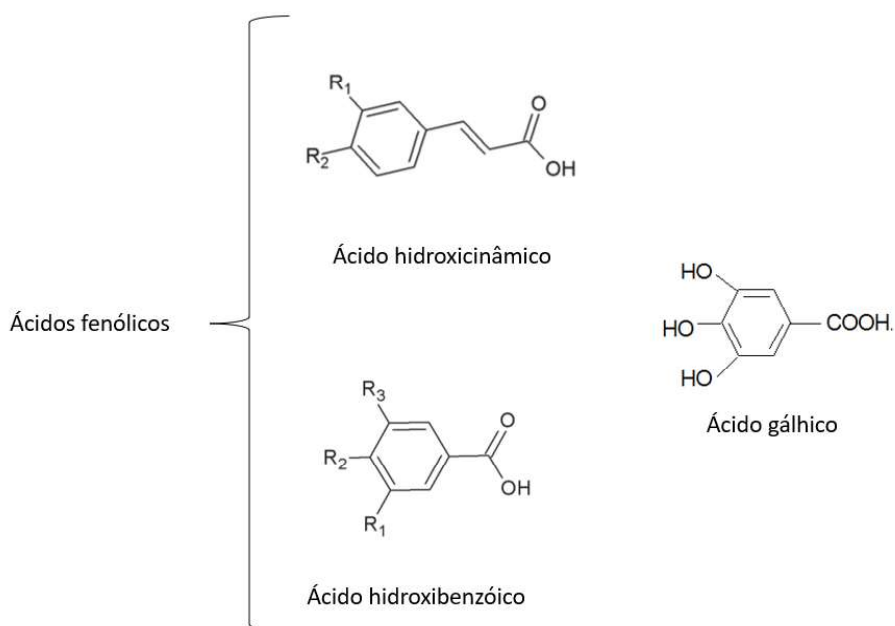
Estes compostos encontram-se presentes em todos os órgãos da planta e desempenham papéis importantes ao nível da estrutura, sinalização celular, defesa contra agressões externas, repelente ou atrativo de insetos, influenciando a cor, a estabilidade oxidativa e o sabor do alimento (de Moraes Arnos, da Costa et al., 2019; Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013; Lin, Xiao et al., 2016; Oroian & Escriche, 2015). A quantidade de compostos fenólicos presentes nos alimentos depende do tipo de matéria prima, da estação do ano em que é colhida, do estágio de maturação, do tipo de cultura e de solo, do armazenamento, entre outros fatores (Bhattacharya, Sood, & Citovsky,

2010; Klepacka, Gujska, & Michalak, 2011). Os compostos fenólicos são principalmente estudados devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e prevenção de várias doenças (Lucci, Saurina, & Núñez, 2017; Ross & Kasum, 2002).

Estes compostos representam uma grande família sendo normalmente divididos em duas grandes classes, não-flavonóides e flavonóides que serão abordados seguidamente.

### 1.4.1. Compostos não flavonóides

A classe dos não-flavonóides é constituída por compostos que contêm um único grupo fenil substituído por um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo (Laura, Moreno-Escamilla, Rodrigo-García, & Alvarez-Parrilla, 2019). Esta família é caracterizada pela presença de ácidos fenólicos como o ácido gálico, o ácido hidroxicinâmico, o ácido hidroxibenzóico, entre outros, diferindo o comprimento da cadeia do grupo carboxílico (Figura 2) (Laura, Moreno-Escamilla et al., 2019; Soares, Brandão et al., 2020; Soares, Brandão et al., 2017).



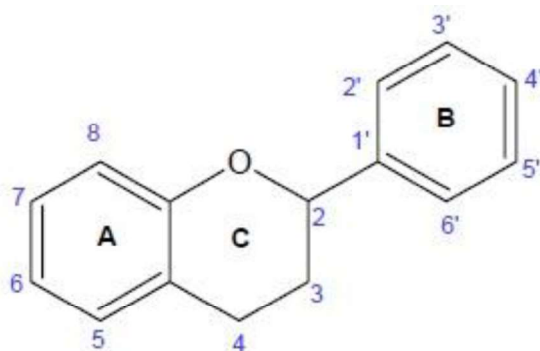
**Figura 2.** Estruturas dos compostos não flavonóides. Adaptado de Soares, Brandão et al. (2020).

Os ácidos hidroxibenzóicos raramente são encontrados na sua forma livre, aparecendo ligados a pequenos ácidos orgânicos, como o ácido quínico, maleico ou tartárico, ou então ligados a componentes estruturais das células vegetais, como a celulose, proteínas ou lignina (Laura, Moreno-Escamilla et al., 2019). Por outro lado o

ácido gálico complexa com polissacarídeos, normalmente glucose, dando origem a uma nova classe de compostos fenólicos, os taninos hidrolisáveis (Laura, Moreno-Escamilla et al., 2019).

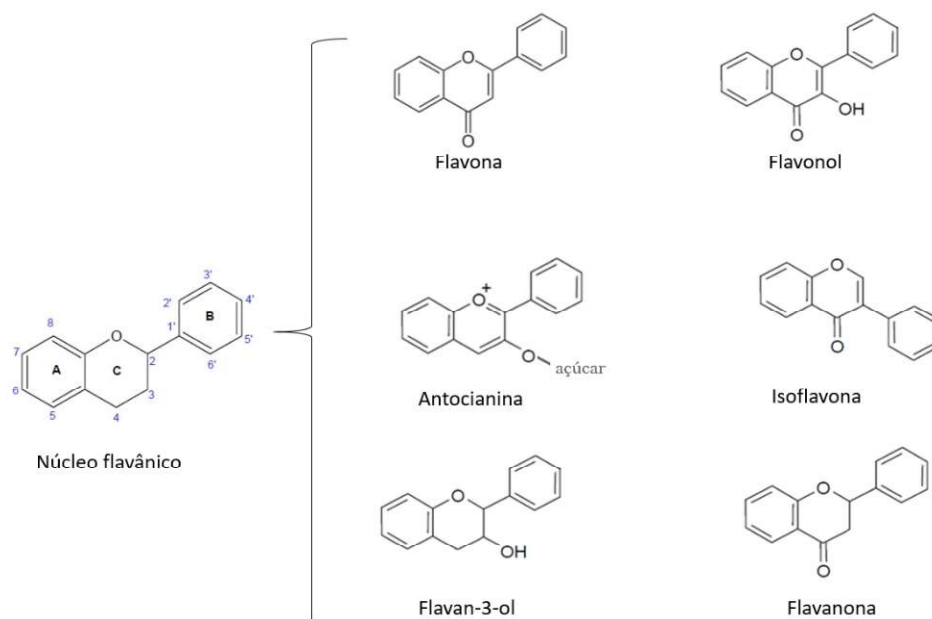
### 1.4.2. Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides são a classe mais importante de compostos fenólicos na alimentação, sendo encontrados em maior quantidade em frutas e hortícolas (Kang, Lee, Otieno, & Ha, 2018). Estes apresentam estruturas muito diversas, tendo por base um núcleo flavânico central, constituído por dois anéis benzénicos (A e B) e um anel heterocíclico (C) (Figura 3) (Kawser Hossain, Abdal Dayem et al., 2016; Soares, Brandão et al., 2017).



**Figura 3.** Núcleo flavânico dos compostos flavonóides. Adaptado de Kang, Lee, Otieno e Ha (2018).

Tendo em conta o grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C, os flavonóides são divididos em seis sub-classes, flavonas (ex. luteolina e apigenina), flavonóis (ex. quercetina e kaempferol), flavanonas (ex. naringenina e hesperdina), flavan-3-óis (ex. catequina e epicatequina) (base de formação dos taninos condensados), antocianinas (ex. cianidina-3-glucósido e delphinidina-3-glucósido) e isoflavonas (ex. genisteína e daidzeína) (Figura 4) (Kawser Hossain, Abdal Dayem et al., 2016; Soares, Brandão et al., 2017).

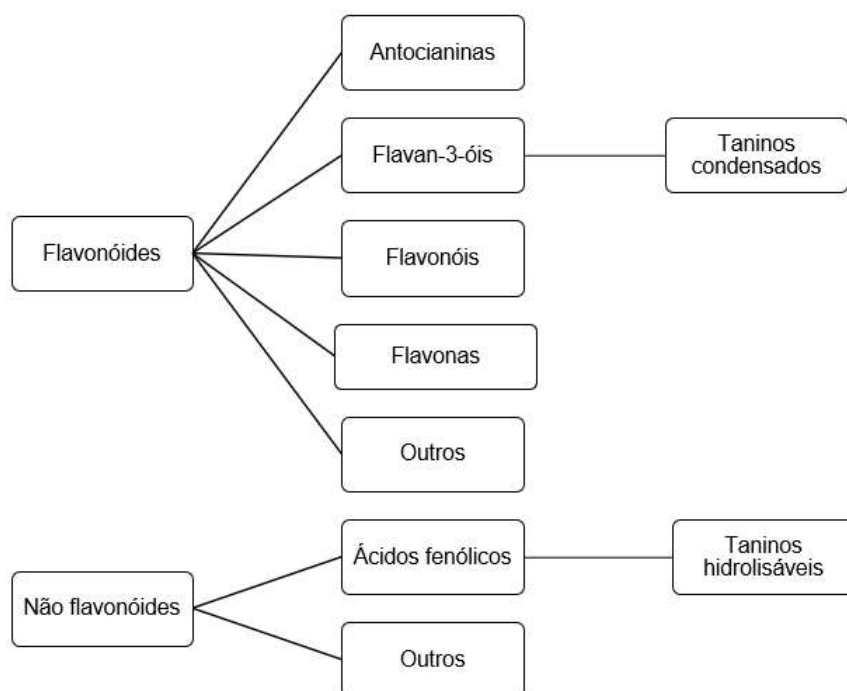


**Figura 4.** Estruturas dos compostos flavonóides. Adaptado de Kang, Lee et al. (2018).

### 1.4.3. Taninos

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água que apresentam peso molecular variável, podendo ocorrer naturalmente em frutas como a romã, framboesa e uva, mas também devido a processos tecnológicos, como por exemplo no vinho tinto devido à migração dos taninos da madeira de carvalho durante o envelhecimento (Chira & Teissedre, 2013; Nascimento, Pinto et al., 2016).

Devido à grande diversidade das suas estruturas e diversos grupos substituintes, os taninos apresentam propriedades distintas que lhes permitem estabelecer diferentes interações com outras moléculas, como polissacarídeos e proteínas nomeadamente proteínas salivares (de Freitas & Mateus, 2001; Jakobek, 2015). De facto, a capacidade para interagir com proteínas é uma característica particular dos taninos, que lhes confere diversas propriedades e na qual assenta a classificação de um composto fenólico em tanino. Estes podem ser divididos, tendo em conta a sua estrutura, em dois grupos principais: os taninos condensados que são derivados de flavan-3-óis, e os taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galhotaninos) que são derivados de ácidos fenólicos (Figura 5) (Sekowski, Ionov et al., 2014; Silva, García-Estévez et al., 2017).



**Figura 5.** Principais classes de compostos fenólicos.

### 1.4.3.1. Taninos condensados

Os taninos condensados, também conhecidos por proantocianidinas, são os taninos mais abundantes na alimentação humana, podendo ser encontrados em maçãs, frutos vermelhos, chocolate, vinho tinto, entre outros (Bulea, Khanb, Nisard, & Niaze, 2020; Smeriglio, Barreca, Bellocco, & Trombetta, 2017).

Os taninos condensados são polímeros de flavan-3-óis, formados por unidades de diastereômeros, (+)-catequinas e (-)-epicatequinas, e seus derivados galhoilados, galhocatequina e epigalhocatequina (Bulea, Khanb et al., 2020; Smeriglio, Barreca et al., 2017; Soares, Brandão et al., 2020). Estes taninos possuem estruturas mais complexas que os taninos hidrolisáveis, além de maiores propriedades medicinais características dos taninos (Bulea, Khanb et al., 2020; Cai, Zhang et al., 2017).

### 1.4.3.2. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico com monossacarídeos (glucose) ou oligómeros de ácido gálico/elágico (Soares, Brandão et al., 2017). Estes compostos, como o próprio nome inspira, podem ser hidrolisados por ácidos fracos e

decompostos por temperaturas altas, formando ácido pirogálico (Jiménez, Esteban-Torres, Mancheño, de las Rivas, & Muñoz, 2014). Estes taninos podem ser divididos em galhotaninos, que aquando da sua hidrólise originam moléculas de açúcar e ácido gálico, e elagitaninos, que na sua hidrólise resultam em açúcar e ácido elágico (Lamy, Pinheiro et al., 2016).

Os galhotaninos são a classe mais simples dos taninos hidrolisáveis, sendo raramente encontrados na natureza (Smeriglio, Barreca et al., 2017). Por outro lado, os elagitaninos estão presentes em muitas famílias de plantas e muitos alimentos como nozes, framboesas, castanhas, entre outros (Lamy, Pinheiro et al., 2016; Landete, 2011). Estes últimos são formados a partir de galhotaninos através da ligação de duas unidades de ácido gálico, formando estruturas complexas com um núcleo central normalmente de glucose, como é exemplo a pentagalhoil-glucose (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose) (PGG) (Newsome, Li, & van Breemen, 2016; Smeriglio, Barreca et al., 2017; Soares, Brandão et al., 2020).

Como já foi referido acima, os taninos têm a capacidade de interagir com proteínas salivares. Alguns estudos apontam que os taninos hidrolisáveis tendem a interagir mais com as proteínas do que os taninos condensados apesar deste últimos serem mais abundantes na alimentação (Esatbeyoglu, Wray, & Winterhalter, 2010; Soares, Mateus, & de Freitas, 2012b).

#### **1.4.4. Importância dos compostos fenólicos na alimentação e na saúde**

Atualmente a saúde tem se tornando um ponto cada vez mais importante na vida das pessoas. O consumidor tem cada vez mais consciência dos benefícios dos alimentos de forma a manter um estilo de vida mais saudável (Yang & Lee, 2020). A precipitação dos compostos fenólicos origina a sensação de adstringência, um atributo problemático não muito apreciado pelo consumidor, que compromete a escolha de certos alimentos levando à não ingestão dos mesmos independentemente do valor nutricional que possam apresentar (Yang & Lee, 2020).

Além das sensações negativas que possam causar, estes compostos são muito reconhecidos na área da alimentação e saúde devido às suas propriedades benéficas para a saúde humana (Rodríguez-Pérez, Segura-Carretero, & del Mar Contreras, 2019).

Estes compostos apresentam funções antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas, que auxiliam no combate de certas doenças como a diabetes tipo 2, obesidade, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancerígenas e proteger da radiação ultravioleta, e na regulação da microbiota intestinal (de Moraes Arnoso, da Costa et al., 2019; Dias, Perez-Gregorio, Mateus, & De Freitas, 2015; Hwang, Oh, Yun, & Jeong, 2011; Li, Li et al., 2014; Silva, García-Estévez et al., 2017; Soares, Soares et al., 2020).

Para que estas funções sejam exercidas é necessário que haja uma eficiente ingestão de compostos fenólicos (Klepacka, Gujska et al., 2011; Lin, Xiao et al., 2016). Para isso é recomendado o consumo de alimentos e bebidas ricos neste tipo de compostos, como é o caso do vinho tinto, romã, framboesa, chá verde, brócolo, entre muitos outros (Amoako & Awika, 2016; Soares, Brandão et al., 2017). Neste trabalho foram utilizados composto fenólicos extraídos do chá verde, brócolo e grainha e ácido tânico, que são referidos a seguir.

#### **1.4.4.1. Chá verde**

O chá é produzido a partir de *Camellia sinensis*, que possui duas variedades principais que são utilizadas na produção de infusões, *Camellia sinensis sinensis* e *Camellia sinensis assamica*, sendo a primeira a mais utilizada (Namal Senanayake, 2013; Sanlier, Gokcen, & Altuğ, 2018). Esta bebida é a mais consumida mundialmente a seguir à água, sendo muito popular em todo o mundo, não só devido ao seu sabor único, mas principalmente pelos benefícios que apresenta para a saúde (Bora, Ma, Li, & Liu, 2018; Graham, 1992). Desde os tempos antigos que o chá é considerado como remédio para melhoramento e prevenção de várias doenças devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, entre outras (Bora, Ma et al., 2018; Chen, Chang et al., 2018; Wei, Yang et al., 2018; Yang, Chen, & Wu, 2014).

Com base no tipo de processamento que é aplicado após a colheita das folhas de *C. sinensis*, o chá pode ser classificado em três tipos principais: chá verde, que não sofre fermentação, chá oolong, que sobre semifermentação, e chá preto, que é fermentado (Saric, Notay, & Sivamani, 2017; Xing, Zhang, Qi, Tsao, & Mine, 2019). O chá mais produzido a nível mundial é o chá preto (78% da produção mundial), sendo consumido normalmente em todo o mundo; seguido do chá verde (20% da produção mundial), que é consumido maioritariamente nos países asiáticos; e por fim o chá oolong

(2% da produção mundial), que é produzido principalmente no sul da China (Butt & Sultan, 2009; Hayat, Iqbal, Malik, Bilal, & Mushtaq, 2015).

O chá verde, originário da Ásia e da Índia, é uma bebida caracterizada por uma mistura de sabores amargos, adstringentes, umami e doces, sendo os dois primeiros os principais (Liu, Luo et al., 2018; Yu, Yeo, Low, & Zhou, 2014). Estes sabores e as propriedades medicinais são originários da composição química da infusão, onde estão incluídos compostos fenólicos, cafeína, aminoácidos e outros compostos (Namal Senanayake, 2013).

Este chá é uma bebida muito rica em compostos fenólicos, sendo os flavan-3-óis, nomeadamente catequinas, os que se encontram em maior percentagem (Bora, Ma et al., 2018). Além das catequinas, este chá também apresenta flavonóis e ácidos fenólicos, apesar destes últimos se encontrarem em muito baixa percentagem (Bora, Ma et al., 2018; Saric, Notay et al., 2017). Alguns estudos já relataram que o conteúdo de catequinas presentes no chá depende da qualidade das folhas de chá e do tipo de infusão (Bora, Ma et al., 2018).

#### **1.4.4.2. Ácido tânico**

O ácido tânico é uma mistura de compostos fenólicos pertencente à família dos taninos hidrolisáveis que pode ser encontrado em vários alimentos derivados de plantas (Basheer & Kerem, 2015; Li, Shaik et al., 2011) ou pode ser utilizado na indústria alimentar como aditivo alimentar segundo o Regulamento de Execução (EU) nº 872/2012 da Comissão (2012). Devido à sua estrutura este apresenta propriedades antibacterianas e antioxidantes características dos compostos fenólicos (Nakamura, Tsuji, & Tonogai, 2003; Tintino, Oliveira-Tintino et al., 2016).

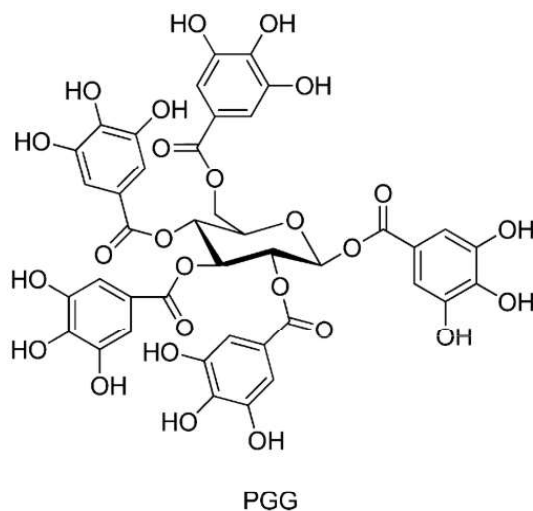
A PGG é um exemplo de um composto fenólico que pode ser obtido a partir de ácido tânico, através de reações de metanólise, sendo que o seu rendimento está relacionado com a pureza desta mistura (Torres-León, Ventura-Sobrevilla et al., 2017).

##### **1.4.4.2.1. Pentagalhoil-glucose (PGG)**

1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (PGG) é um composto fenólico que pertence à família dos taninos hidrolisáveis, nomeadamente galhotaninos, e se caracteriza por apresentar um núcleo de glucose ligada a cinco grupos galhoil (Figura 5)(Niemetz & Gross, 2005; Torres-León, Ventura-Sobrevilla et al., 2017). Devido à sua estrutura, a PGG é caracterizada por apresentar uma vasta gama de atividades biológicas,



nomeadamente antioxidante, que podem ajudar na prevenção de diversas doenças cancerígenas (Kim, Choi et al., 2015; Tian, Li, Ji, Zhang, & Luo, 2009).



**Figura 6.** Estrutura da pentagalhoil-glucose (PGG). Adaptado de Li, Shaik et al. (2011).

A PGG é utilizada como modelo de estudo em interações, podendo ser obtida por hidrólise a partir de ácido tânico visto que este possui uma estrutura central semelhante à estrutura da PGG. Esta reação de metanólise do ácido tânico com metanol gera não apenas PGG mas também metil galhato, um subproduto (Li, Shaik et al., 2011).

#### 1.4.4.3. Brócolo

O brócolo (*Brassica oleracea var. itálica*) é um vegetal da família *Brassicaceae* amplamente cultivado em muitos países da Europa, América e Ásia (El-Magd, Mahmoud, Hafiz, & Ali, 2013). A família na qual o brócolo se insere inclui várias espécies de hortícolas que constituem grande parte da alimentação em todo o mundo, e são caracterizadas pelas suas atividades antioxidantes e sabores amargos, adstringentes, doces e pungentes, que podem afetar a aceitação dos consumidores (Cartea, Francisco, Soengas, & Velasco, 2011; Li, Lee et al., 2018; Moreno, Carvajal, López-Berenguer, & García-Viguera, 2006).

O brócolo é uma hortícola rica em glucosinolatos, que apresentam propriedades anticancerígenas; compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides, ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados; vitaminas e minerais; entre outros (Vasanthi, Mukherjee, & Das, 2009).

## 1.5. Propriedades organolépticas

As sensações orais experimentadas ao ingerir um alimento ou bebida envolvem muitas vias sensoriais diferentes: sabor (doce, salgado, ácido, amargo e umami), aroma (via retronasal) e vias responsáveis pela percepção de temperatura, sensação/textura na boca, entre outros (Dinnella, Recchia, Tuorila, & Monteleone, 2011). A escolha e consumo de certos produtos alimentares está fortemente dependente das propriedades sensoriais do produto e das suas intensidades (Dinnella, Recchia et al., 2011; Duffy, 2007).

Os compostos fenólicos apresentam dois descritores principais: adstringente e amargo, sendo que ambos provocam reações negativas ao consumidor quando percebidas em altas intensidades (Jaeger, Axten, Wohlers, & Sun-Waterhouse, 2009). Vários consumidores consideram a sensação de amargor e adstringência como a principal razão da rejeição de certos alimentos ricos em compostos fenólicos, apesar das suas propriedades benéficas para a saúde (Dinnella, Recchia et al., 2011).

### 1.5.1. Modulação da adstringência e amargor

Os alimentos à base de plantas contêm altos níveis de compostos fenólicos, que podem levar às sensações de adstringência e amargor, sensações que não são bem aceites pelos consumidores (Nadathur & Carolan, 2017). Para melhor aceitação desses alimentos, é necessário modular estas sensações. Existem várias formas de reduzir a adstringência sentidas aquando do consumo, mas a estudada neste trabalho é a adição de polissacarídeos de forma a impedir a ligação dos taninos às proteínas salivares (Nadathur & Carolan, 2017).

## 1.6. Polissacarídeos

Os polissacarídeos, ou carboidratos, são moléculas orgânicas que apresentam maior abundância na Terra e desempenham um papel fundamental na manutenção da vida (Amoako & Awika, 2016). Estes são indispensáveis enquanto ingredientes alimentares devido ao impacto que têm ao nível da textura, cor, sabor e outros atributos cruciais para a qualidade dos alimentos (Amoako & Awika, 2016).

Além disso estas moléculas têm a capacidade de reduzir ou inibir a interação dos compostos fenólicos com as proteínas salivares (Brandão, Silva et al., 2017).

### 1.6.1. Interação polissacarídeos-taninos-proteínas salivares

O efeito dos polissacarídeos na ligação dos taninos às proteínas salivares tem sido explicado com base em dois mecanismos principais: o mecanismo por competição, em que existe formação de complexos entre taninos e polissacarídeos, fazendo com que estes últimos compitam pela ligação às proteínas (Carvalho, Mateus et al., 2006; Mateus, Carvalho, Luís, & de Freitas, 2004); e o mecanismo do complexo ternário, no qual não existe uma verdadeira competição mas sim a formação de um complexo solúvel de tanino-proteína-polissacarídeos (Ramos-Pineda, García-Estévez, Dueñas, & Escribano-Bailón, 2018).

Estes mecanismos de ligação dependem essencialmente do tamanho e estrutura dos taninos e da estrutura dos polissacarídeos, sendo a ramnogalacturano II (Rg II) e as manoproteínas as moléculas mais utilizadas para a redução do efeito de adstringência (Boulet, Trarieux et al., 2016; Cai, Gaffney, Lilley, & Haslam, 1989; Le Bourvellec, Bouchet, & Renard, 2005). Esta última afirmação é comprovada por Brandão, Silva et al. (2019) em que foi estudado o efeito de polissacarídeos naturalmente presentes no vinho, onde entre eles se encontrava a Rg II, e verificou-se que este polissacarídeo é mais eficiente na inibição da ligação das PRPs aos taninos do que os outros polissacarídeos estudados.

### 1.6.2. Polissacarídeos da casca de banana

A fruta é uma parte importante da alimentação saudável do ser humano. A banana é uma fruta da família *Musaceae*, conhecida pelo seu alto valor nutritivo e fonte de magnésio e potássio, que é produzida nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a Índia o seu maior produtor contribuindo com cerca de 26,08% da produção total (Aquino, Salomão et al., 2016; Azarudeen & Nithya, 2021; FAO, 2019). Esta fruta é consumida em várias partes do mundo, podendo ser ingerida em cru ou em produtos processados como farinhas, chips e purés (utilizados para produção de néctares, smoothies entre muitos outros produtos) (Oliveira, Rosa et al., 2016).

A casca da banana é simples de remover, o que torna o seu manuseio fácil e conveniente (Aquino, Salomão et al., 2016). Esta representa cerca de 30% da fruta, sendo o principal subproduto da indústria da banana e do quotidiano (Azarudeen & Nithya, 2021; Oliveira, Rosa et al., 2016). Geralmente a casca é descartada em aterros sanitários ou no lixo, o que representa um problema ambiental devido ao seu alto teor

de azoto, fósforo e água, o que as torna muito suscetíveis a modificações por microrganismos (González-Montelongo, Gloria Lobo, & González, 2010; Oliveira, Rosa et al., 2016; Vu, Scarlett, & Vuong, 2018).

Happi Emaga, Robert, Ronkart, Wathelet e Paquot (2008) demonstraram que a casca de banana contém vários polissacarídeos, dos quais são exemplos a glucose, galactose, arabinose, xilose, ramnose, ácido galacturónico, entre outros.

Assim, a utilização da casca da banana como fonte de compostos de alto valor, como por exemplo obtenção de açúcares eficazes na modulação da adstringência, apresenta-se como uma alternativa vantajosa, não só do ponto de vista económico como também ambiental, promovendo-se assim uma economia circular.

## 2. Objetivos

O estudo da interação dos polissacarídeos na ligação dos taninos com as proteínas salivares apresenta um crescente interesse tendo em conta o importante papel na modulação da adstringência em produtos ricos em taninos e consequente aceitação destes produtos pelo consumidor (Adrar, Madani et al., 2019). Apesar dos muitos estudos já efetuados sobre este assunto, a maioria dos trabalhos estuda polissacarídeos obtidos a partir de matrizes alimentares semelhantes e com estruturas muito similares. Este trabalho vai focar-se no isolamento de polissacarídeos a partir de subprodutos alimentares, nomeadamente a casca da banana, pretendendo obter-se estes com estruturas e atividades diversificadas, de forma a colmatar a ausência de conhecimento sobre a valorização deste subproduto para a modulação da adstringência, numa vertente de economia circular.

Os objetivos deste trabalho são compreender como a interação entre diferentes compostos fenólicos, proteínas salivares, e polissacarídeos pode influenciar a perceção da adstringência, assim como verificar a influência da estrutura e concentração dos polissacarídeos na interação proteínas salivares-taninos.

## 3. Material e métodos

### 3.1. Extração de compostos fenólicos

#### 3.1.1. Chá verde

A extração de compostos fenólicos de chá verde foi realizada segundo o método de Soares, Soares et al. (2020) com algumas modificações. O extrato de compostos fenólicos de chá verde foi obtido de folhas secas e moídas de *Camellia sinensis* de origem portuguesa. Uma amostra de 20 g de folhas secas de chá verde foi extraída quatro vezes com 500 mL de 50% etanol em atmosfera de árgon e colocadas durante 30 min em agitação à temperatura ambiente. Entre cada extração centrifugou-se a 14 000 rpm, 4°C, durante 20 min, para recuperação do precipitado. Seguidamente evaporou-se o sobrenadante a pressão reduzida para remoção de etanol. O resíduo evaporado foi extraído sete vezes com 500 mL de clorofórmio para retirar clorofilas, e seis vezes com 500 mL de acetato de etilo para retirar açúcares e ácidos fenólicos mais simples. Após a evaporação do acetato de etilo, o resíduo rico em flavonoides foi diluído e aplicado num cartucho Oasis HLB 35cc da Waters, previamente condicionado com 1,5 volume de coluna (vc) de metanol e 1,5 vc de água destilada. Após aplicação da amostra no cartucho, esta foi lavada com 5% de metanol para remoção de sais e proteínas e por fim eluída com 6 vc de metanol. O metanol foi evaporado a pressão reduzida, adicionando-se água para manter o mesmo volume. Por fim a solução obtida foi congelada e liofilizada.

Após liofilização, foi preparada uma solução de extrato de chá verde de concentração de 1,0 g/L. Essa solução foi analisada num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Jasco LC-4000 equipado com um foto detetor de arranjo de díodos e uma coluna C18 de fase reversa (250 mm x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula). A coluna foi mantida a uma temperatura de 20° - 25°C. Os solventes usados foram, A: 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) e B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente foi: 10% B (0-50 min), 28% B (52 min), e 100% B (60 min) e estabilizando em 10% B (70 min). O comprimento de onda de deteção foi 280 nm.

### 3.1.2. Brócolo

O extrato de compostos fenólicos foi obtido a partir de brócolos (*Brassica oleracea* var. *italica*) triturados e liofilizados. Uma amostra de 10 g de brócolo foi extraída quatro vezes com 250 mL de 80% metanol sob atmosfera de árgon e colocadas em agitação à temperatura ambiente durante 1h. Entre cada extração foram realizadas centrifugações a 14 000 rpm, 4°C, durante 5 min, separando-se e filtrando-se os sobrenadantes. Os sobrenadantes obtidos foram combinados e submetidos a evaporação a pressão reduzida para remoção de metanol. Após evaporação, a solução obtida foi aplicada num cartucho de C18 de 40-63 µm da Merck que foi condicionado com 2 vc de metanol e 3 vc de água destilada. A amostra foi aplicada no cartucho, lavada com 5 vc de água destilada para remoção de interferentes mais polares e 2 vc de 5% de metanol para remoção dos restantes interferentes apolares e por fim eluídos os compostos de interesse com 6 vc de solução de acetonitrilo:metanol (90:10), separando-se em 2 frações, sendo a primeira alaranjada e a que contém os compostos de interesse. As amostras foram evaporadas a pressão reduzida, adicionando-se água para manter o mesmo volume. Por fim foram congeladas e liofilizadas.

Cada fração foi analisada num sistema HPLC Jasco LC-4000 equipado com um foto detetor de arranjo de díodos e uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula). A coluna foi mantida a uma temperatura de 20° - 25°C. Os solventes usados foram, A: 6% de ácido acético em água (v/v) e B: 100% de acetonitrilo com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente foi: 0% B (0-45 min), 15% B (60 min), 30% B (70 min), e 100% B (80 min) e estabilizado em 0% B (86 min). Os comprimentos de onda de deteção foram 280 nm (ácidos hidroxibenzoicos), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos), 360 nm (flavonas e flavonóis) e 520 nm (antocianinas).

As frações também foram analisadas por LC-MS num sistema Finnigan Surveyor equipado com um detetor de massa Finnigan LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San José, Califórnia, EUA) com uma fonte de ionização de pressão atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface de ionização por eletropulverização (ESI, *Electrospray Ionization*). Utilizou-se uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula). Os solventes utilizados foram, A: 1% de ácido acético em água (v/v) e B: 1% de ácido acético em acetonitrilo. As amostras foram analisadas com os mesmos gradientes, fluxos e volume de injeção usados na análise

por HPLC. A temperatura capilar foi de 325°C. Os espectros foram registados em modo negativo.

## **3.2. Hemi-síntese de compostos galhoilados**

### **3.2.1. Pentagalhoil-glucose (PGG)**

Foi realizada uma hemi-síntese da PGG segundo o métodos de Chen e Hagerman (2004), em que foram dissolvidas 5 g de ácido tânico em 100 mL de 70% de metanol com tampão acetato (0,1 M, pH 5.0). Imediatamente a seguir foi ajustado o pH com hidróxido de sódio 1 M inicialmente e com hidróxido de sódio 5 M em seguida até se obter um pH de 6. Evaporou-se a pressão reduzida o metanol, adicionando-se água para manter o volume. Extraíu-se a amostra com 3 volumes de éter dietílico e 3 volumes de acetato de etilo, evaporando-se a pressão reduzida o acetato de etilo com adição de água para manter o volume. A solução foi centrifugada a 6 000 rpm, 4°C, durante 10 min. Após liofilização o composto resultante foi analisado num sistema HPLC Jasco LC-4000 equipado com um foto detetor de arranjo de díodo e uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula). A coluna foi mantida a uma temperatura de 20°- 25°C. Os solventes usados foram, A: 1% de ácido fórmico em água (v/v) e B: 1% de ácido fórmico em acetonitrilo (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente foi: 11% B (0-32 min), 29% B (47 min), 34% B (49 min), e 100% B (54 min) e estabilizando em 11% B (62 min). O comprimento de onda de deteção foi 280 nm.

### **3.2.2. Outros derivados de galhoil-glucose**

Foram realizadas seis hemi-sínteses recorrendo a modificações do método de Chen e Hagerman (2004), nomeadamente duas com diferentes tempos de reação (3h e 7h), duas com diferentes temperaturas (45°C e 85°C) e duas com diferentes percentagens de metanol (50% e 100%). Inicialmente foram realizadas quatro sínteses dissolvendo 2 g de ácido tânico em 40 mL de 70% de metanol com tampão acetato (0,1 M, pH 5.0) e duas sínteses com alteração na percentagem de metanol usado, nomeadamente 50% e 100%. Colocaram-se duas a reagir em agitação a 65°C durante 3h e 7h e outras duas a 45°C e 85°C durante 7h. Imediatamente a seguir foi ajustado o pH com hidróxido de sódio 1 M inicialmente e com hidróxido de sódio 5M em seguida até se obter um pH de 6. Evaporou-se a pressão reduzida o metanol, adicionando-se água para perfazer o volume. Extraíu-se a amostra com 3 volumes de éter dietílico e 3 volumes de acetato de



etilo, evaporando-se a pressão reduzida o acetato de etilo com adição de água para manter o volume. A solução foi centrifugada a 6 000 rpm, 4°C, durante 10 min. Posteriormente todas as sínteses foram analisadas num sistema HPLC Jasco LC-4000 equipado com um foto detetor de arranjo de díodo e uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula). A coluna foi mantida a uma temperatura de 20° - 25°C. Os solventes usados foram, A: 1% de ácido fórmico em água (v/v) e B: 1% de ácido fórmico em acetonitrilo (v/v) com fluxo de 0.5 mL/min. O gradiente foi: 11% B (0-32 min), 29% B (47 min), 34% B (49 min), e 100% B (54 min) e estabilizando em 11% B (62 min) O comprimento de onda foi detetado a 280 nm.

### 3.3. Extração de polissacarídeos da casca de banana

A extração de polissacarídeos da casca da banana foi realizada segundo o método de Nunes, Saraiva e Coimbra (2008) com algumas modificações. O extrato de polissacarídeos foi obtido de casca de banana liofilizada e triturada. Para a obtenção do resíduo insolúvel em álcool (AIR) foram extraídas 35 g de casca de banana duas vezes com 140 mL de 85% etanol a 90°C durante 10 min em refluxo e com o condensador ligado. Após arrefecimento da mistura filtrou-se por vácuo com um funil poroso e um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C). Seguidamente o resíduo foi lavado com 140 mL de 85% etanol e com 70 mL de éter, filtrando como descrito anteriormente cada uma das lavagens. O resíduo foi recolhido e deixado a secar à temperatura ambiente até ao dia seguinte.

O AIR (24,2g) que se obteve foi pesado e extraído sequencialmente com: (1) 1800 mL de água, durante 16h a 4°C; (2) 1500 mL água, durante 6h à temperatura ambiente; (3) 1800 mL de Imidazole 0,5 M/ácido clorídrico (HCl) pH 7, durante 16h à temperatura ambiente; (4) 1500 mL de Imidazole 0,5 M/HCl pH 7, durante 2h à temperatura ambiente; (5) 1800 mL de carbonado de sódio 50 mM + borohidreto de sódio 20 mM, durante 16h a 4°C; (6) 1500 mL de carbonado de sódio 50 mM + borohidreto de sódio 20 mM, durante 2h à temperatura ambiente. Após cada extração, os sobrenadantes foram separados do resíduo insolúvel através de filtração com um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C). Os sobrenadantes das diferentes extrações foram guardados separadamente com exceção das extrações com Imidazole 0,5 M/HCl pH 7, que se juntaram. Antes da diálise, todos os extratos foram concentrados por evaporação a pressão reduzida. Os extratos de carbonato de sódio foram neutralizados para pH 5-6

no frio com ácido acético glacial, antes da diálise. Todos os extratos foram dialisados com água desionizada (6-8 kDa) durante aproximadamente 72h, com trocas de água, no primeiro dia, de 2h em 2h, no segundo dia, 3 vezes ao dia e no último, 2 vezes ao dia. As frações foram congelados e liofilizados.

### **3.4. Isolamento de saliva e proteínas salivares**

A saliva foi coletada de 12 voluntários saudáveis e não fumantes, homens e mulheres. A saliva foi coletada às 14h, sendo todos os participantes instruídos a não ingerirem alimentos ou bebidas pelo menos 1 hora antes da doação. A saliva foi tratada com TFA (concentração final de 0,1%). A solução foi centrifugada a 13 400 rpm durante 5 min e separados os sobrenadantes dos precipitados. A coleta de saliva foi aprovada pelo comité de ética da Universidade do Porto (CES183/18).

### **3.5. Interação entre compostos fenólicos, proteínas salivares e polissacarídeos**

Inicialmente foram realizadas interações de diferentes compostos fenólicos extraídos do chá verde, do brócolo e da grainha, assim como o ácido tânico em diferentes concentrações, com proteínas salivares, na proporção de 150 µL de saliva e 75 µL de composto fenólico. As concentrações finais foram: 0,125; 0,25; 0,50 e 1,0 g/L de extrato de brócolo, 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de extrato de chá verde, 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 g/L de extrato de grainha e 0,1; 0,3; 0,5 e 0,8 g/L de ácido tânico. A reação ocorreu durante 15 min a 37°C, seguidamente as amostras foram centrifugadas a 13 400 rpm, durante 5 min, separando-se os sobrenadantes dos precipitados.

Após estas interações, foi escolhida a concentração de extrato que precipitasse aproximadamente 70% das proteínas salivares: 1,0 g/L de extrato de brócolo, 0,4 g/L de extrato de chá verde, 0,5 g/L de extrato de grainha e 0,1 g/L de ácido tânico, foi realizada uma interação dos compostos fenólicos com os polissacarídeos e as proteínas salivares que se deu em duas fases. Primeiramente, os diferentes extratos de compostos fenólicos interagiram com os polissacarídeos extraídos da casca de banana nas concentrações finais de 1 g/L, 2 g/L e 3 g/L durante 30 min à temperatura ambiente, nunca ultrapassando a concentração de 12 g/L do stock de polissacarídeo. Em seguida,

esta mistura foi adicionada à saliva e a reação ocorreu durante 15 min a 37°C. Por fim as amostras foram centrifugadas a 13 400 rpm, durante 5 min, separando-se os sobrenadantes dos precipitados que foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (5.1. de Material e métodos) e por HPLC (5.2. de Material e métodos).

Ainda foi testada a interação com uma infusão de chá verde obtida com diferentes tempos de incubação. Para isso, foi colocada uma saqueta de chá verde da marca Continente em 200 mL de água a 100°C sendo retirada uma alíquota de 1 mL aos 2, 5 e 10 min. A cada infusão foi adicionado 1 mg de polissacarídeos obtidos com água 16h e imidazole de forma a obter-se uma concentração de 9 mg/mL e deixou-se a reagir por 30 min à temperatura ambiente. Por fim, estas amostras foram acionadas à saliva, deixando-se a reagir por 15 min a 37°C, centrifugando-se no fim a 13 400 rpm por 5 min.

### 3.5.1. SDS-PAGE

As interações entre os compostos fenólicos e proteínas salivares e a influência dos polissacarídeos nessa interação foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) em sistema de tris-tricina, seguindo o método de Fontana, de Laureto, Spolaore e Frare (2012). Este método baseia-se na separação de proteínas de acordo com os seus tamanhos usando um gel de acrilamida de 16%. Foram retirados 15 µL de cada sobrenadante e adicionados 15 µL de tampão de amostra (65,8 mM Tris-HCl pH 6.8, 26,3% w/v glicerol, 2,1% SDS, 5% v/v β-Mercaptoetanol e 0,01% azul de bromoferol). As amostras foram desnaturadas a 100°C por 10 min. Foram utilizados 2 tampões de corrida: tampão do ânodo 0,25 M Tris-HCl pH 8.3, 1,92 M glicina e 1% SDS; e tampão do cátodo 1 M Tris-Base pH 8.3, 1 M tricina e 1% SDS. Os marcadores de peso molecular foram da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Unstained Standards). A separação foi realizada num aparelho de eletroforese Bio-Rad Mini Protean Cell (Bio-Rad) com voltagem entre os 120 V e os 145 V. Após o fim da eletroforese, os géis foram fixados com solução de fixação de água:metanol:ácido acético (53:40:7 v/v/v) por 30 min e corados com Imperial Protein Stain, reagente à base de corante Coomassie R-250 por 10 min. O processo de descoloração foi realizado por lavagem dos géis com solução de água:metanol:ácido acético (70:20:10 v/v/v).

### 3.5.2. Análise por HPLC

Os sobrenadantes resultantes destas interações assim como os controlos de saliva foram analisados por um sistema HPLC Lachrom Merck Hitachi (L-7100) com uma coluna Kinesis Telos C8 (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) para análise das proteínas salivares. O comprimento de onda de deteção foi 214 nm, analisado por um detetor UV-Vis (L-7420). Os solventes utilizados foram A: 0,2% TFA em água (v/v) e B: 0,2% TFA em acetronitrilo:água (80:20 v/v) com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente foi: 18% B (0-10 min), 11% B (50 min), 55% B (54 min), e 100% B (67 min) e estabilizando em 18% B (77 min).

Em seguida, as mesmas interações foram analisadas num sistema HPLC Jasco LC-4000 equipado com um foto detetor de arranjo de díodos e uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,7 mm, 2,7 µm de diâmetro de partícula) para análise dos compostos fenólicos. A coluna foi mantida a uma temperatura de 20°-25°C. Para análise do extrato de grainha foram utilizados os solventes A: 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) e B: 0,1% de ácido fórmico em acetronitrilo (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente foi: 0% B (0-3 min), 10% B (37 min), 16% B (40 min), 20% B (55 min), 40% B (62 min), e 100% B (70 min) e estabilizado em 0% B (80 min). O comprimento de onda de deteção foi 280 nm.

Para obtenção do perfil do ácido tânico foram utilizados os solventes A: 0,1% ácido fórmico em água (v/v) e B: 0,5% de ácido fórmico em acetronitrilo (v/v) com fluxo de 0.5 mL/min. O gradiente foi: 11% B (0-32 min), 29% B (47 min), 34% B (49 min), e 100% B (54 min) e estabilizando em 11% B (62 min). O comprimento de onda de deteção foi 280 nm.

A análise do extrato de chá verde foi realizada como descrita anteriormente no ponto 1.1. de Material e métodos. A fração do extrato de brócolo também seguiu o mesmo método descrito em 1.2. de Material e métodos, apenas se trocando o solvente A para 0,5% de ácido acético em água (v/v).

### 3.6. Análise sensorial de infusões de chá verde

Para testar a perceção de diferenças sensoriais entre duas amostras de infusão de chá verde, com e sem polissacarídeos extraídos da casca da banana, foram utilizados dois testes triangulares, nos quais foram utilizadas amostras de infusão de chá verde e

infusão de chá verde com polissacarídeo extraído com água 16h e imidazole. Aos 5 provadores presentes, 3 do sexo feminino e 2 do sexo masculino, foi pedido que identificassem a amostra que consideravam diferente de entre as 3 amostras fornecidas de forma aleatória para cada participante, sendo uma diferente e duas iguais.

Para a preparação das amostras foi inicialmente fervidos 200 mL de água mineral, e colocada uma saqueta de chá verde da marca Continente durante 10 min. Em seguida o chá obtido foi deixado a 4°C por 30 min para arrefecimento, ao fim do qual foi adicionado 35 mL de chá aos polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole da casca da banana de forma a obter-se duas soluções de concentração de 3 g/L cada. Estas misturas foram deixadas a reagir por 30 min recorrendo-se ao ultrassom, com adição de gelo, para melhor dissolução. Por fim foram colocados 5 mL de chá verde e chá verde com polissacarídeo, ambos refrigerados, em cada copo de forma aleatória para cada provador e iniciada a prova. Entre as duas partes da prova houve um intervalo de 30 min.

### 3.7. Análise estatística

Para o estudo por HPLC foram realizadas no mínimo três replicas independentes de cada interação, sendo os valores expressos em média e desvio padrão da média (*Standard Error of the Mean*, SEM). Os dados foram analisados através de análise da variância a dois fatores (two-way ANOVA) com teste de Tukey. Todos os dados estatísticos foram processados usando o GraphPad Prism versão 8.4.3 para Windows (San Diego, California). Os valores estatisticamente diferentes estão indicados ( $p < 0,05$ ).

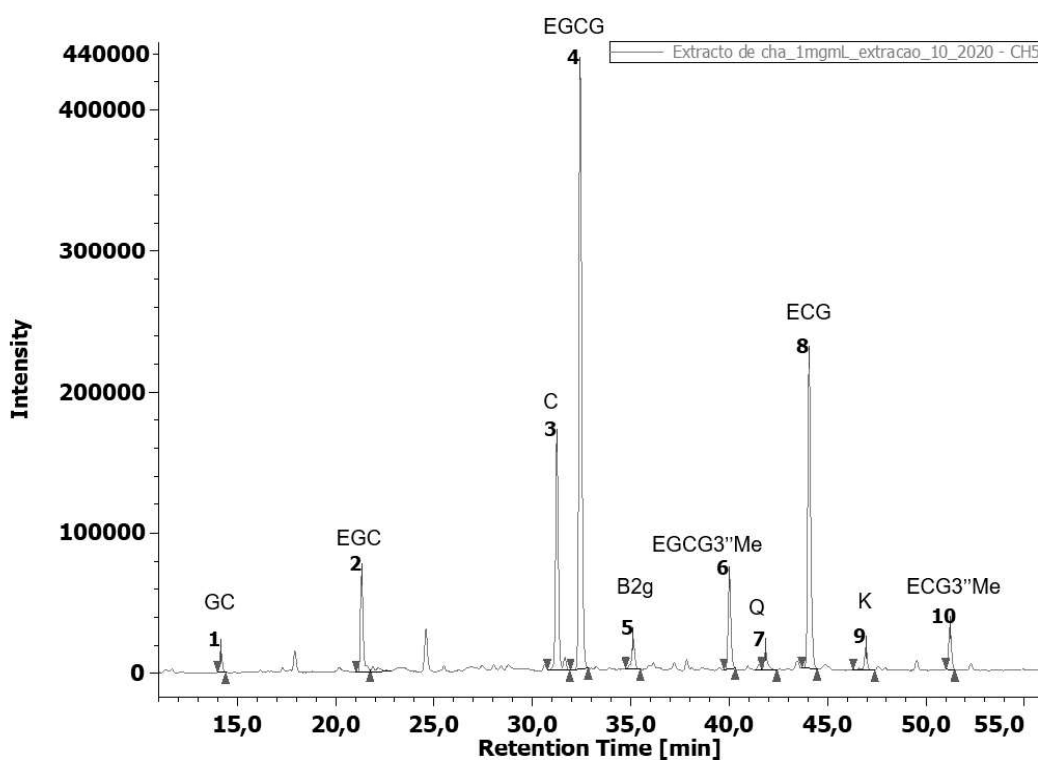
Para a análise sensorial da infusão de chá verde, os dados obtidos foram analisados com recurso à Tabela T8 de Meilgaard, Carr e Civille (1999) disponível no Anexo 1.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Caracterização dos extratos de compostos fenólicos

#### 4.1.1. Chá verde

A extração de compostos fenólicos do chá verde foi realizada segundo método descrito na secção 1.1. de Material e métodos. O método de extração já havia sido previamente otimizado. A composição em compostos fenólicos do extrato obtido foi determinada por comparação com LC-MS (Figura 1A) de trabalhos anteriores (Soares, Soares et al., 2020) (Tabela 1), obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 7.



**Figura 7.** Cromatograma obtido por HPLC do extrato de chá verde detetado a 280 nm. GC – galhocatequina; EGC – epigalhocatequina; C – catequina; EGCG – epigalhocatequina galhato; B2g – dímero de procianidinas; EGCG3''Me – epigalhocatequina-3-O-galhato; Q – quercetina; ECG – epicatequina galhato; K – kaempferol e ECG3''Me – epicatequina-3-O-galhato.

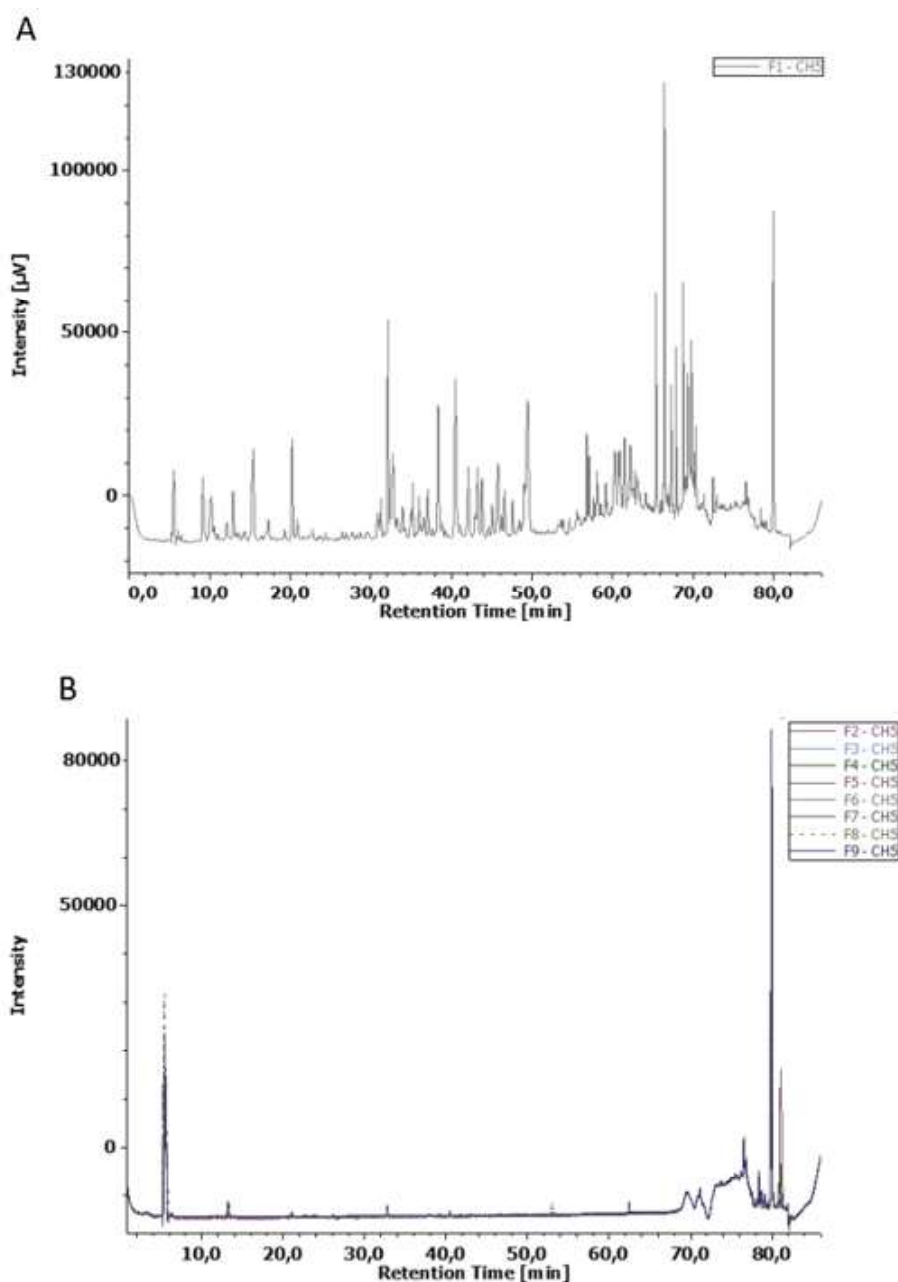
**Tabela 1.** Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de chá verde. Adaptado de Soares, Soares et al. (2020). Rt - tempo de retenção.

Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	Composto
1	12,16	305	Galhocatequina (GC)
2	17,41	305	Epigalhocatequina (EGC)
3	27,08	289	Catequina (C)
4	28,24	457	Epigalhocatequina galhato (EGCG)
5	30,14	729	Procianidina dimérica B2 3-O-galhato (B2g)
6	36,05	470	Epigalhocatequina-3-O-galhato (EGCG3''Me)
7	37,58	301	Quercetina (Q)
8	40,34	441	Epicatequina galhato (ECG)
9	43,05	285	Kaempferol (K)
10	47,91	455	Epicatequina-3-O-galhato (ECG3''Me)

De acordo com o cromatograma obtido (Figura 7, Tabela 1), verifica-se que o extrato de chá verde apresenta maior quantidade de epigalhocatequina galhato (EGCG, pico 4), epicatequina galhato (ECG, pico 8) e catequina (C, pico 3), e outros compostos fenólicos em menor quantidade (Tabela 1). Em resumo, este extrato mostrou-se rico em composto de catequina e epicatequina esterificados com grupos galhoilo. A partir de 20 g de folhas de *C. sinensis* trituradas extraíram-se no total 1,790 g de extrato de chá verde liofilizado.

#### 4.1.2. Brócolo

Para a extração de compostos fenólicos do brócolo realizou-se uma extração com quatro ciclos de 80% metanol, com duração de 1h cada. O extrato obtido foi fracionado por passagem por um cartucho de C18, sendo a separação efetuada com base na avaliação visual de bandas de cores diferentes. Inicialmente obtiveram-se nove frações, mas após análise por HPLC verificou-se que apenas a fração 1 (F1) apresentava compostos de interesse e as restantes frações (F2 -F9) apresentavam o mesmo perfil (Figura 8), optando-se por juntá-las numa única fração. Para melhor compreensão optou-se por designar a fração 1 por extrato de brócolo.



**Figura 8.** Cromatogramas obtidos por HPLC da fração 1 (A) e das frações 2 a 9 (B) do extrato de brócolo, no comprimento de onda de 280 nm.

A partir de 70 g de brócolo triturado extraíram-se no total 158,7 mg de extrato de brócolo liofilizado, obtendo-se um rendimento de 0,23%. Para identificação dos compostos extraídos foi realizada uma análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) (Figura 9), e os compostos identificados foram registados na Tabela 2.



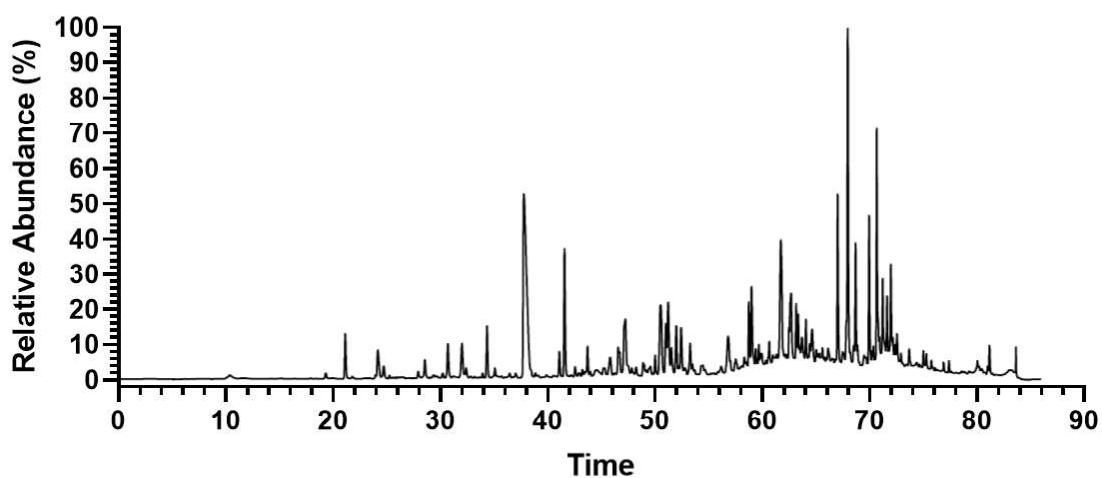


Figura 9. Espectro de massa de LC-MS do extrato de brócolo.

Tabela 2. Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de brócolo. A identificação foi feita com base em literatura e/ou nos padrões de fragmentação. Rt – tempo de retenção.

Nº	RT (min)	$[M-H]^{-1}$ m/z	MS/MS	Composto
1	19,48	<b>383,47</b> ; 465,03; 541,07	-	Não identificado
2	21,20	326,19	265,87; 134,33	Não identificado
3	24,28	536,41; 547,39; <b>560,03</b>	-	Não identificado
4	28,09	577,13	-	Apigenin-7-O-rutinoside/ Apigenin-7-O-neohesperidoside
5	28,71	547,19	-	Sinapoly-gentiobiose
6	30,71	547,32; 359,45	-	Não identificado
7	32,15	<b>299,38</b> ; <b>335,23</b> ; 457,11; <b>598,88</b> ; 634,74	-	4-( $\beta$ -D-Glucopyranosyloxy)benzoic acid/ Salicyloyl-glucose
8	32,56	577,13	-	Apigenin-7-O-rutinoside/ Apigenin-7-O-neohesperidoside
9	34,07	590,1	-	Não identificado
10	34,44	577,26	516,82; 355,03; 295,22; 265,08; 193,30	Não identificado
11	35,23	547,19	-	Não identificado
12	37,15	607,13	-	Kaempferol 3-glucoside-7-glucoside

**Tabela 2 (cont.).** Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de brócolo. Todos os compostos apresentam uma identificação presumida. Rt – tempo de retenção.

Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	MS/MS	Composto
13	37,93	853,09; 649,31; 505,41; <b>407,22</b> ; 263,12	-	Não identificado
14	41,16	<b>846,63</b> ; <b>823,08</b> ; 787,36; 740,26	-	Não identificado
15	41,57	<b>831,00</b> ; 807,18; 359,25; 179,03	750,93; 709,27; 608,87; 447,13	Não identificado
16	42,68	<b>830,60</b> ; 807,12; 771,39	-	Não identificado
17	43,77	<b>861,00</b> ; 837,25	800,53; 698,07; 639,00	Não identificado
18	44,05	359,25	-	Não identificado
19	45,86	<b>963,39</b> ; 606,93; 547,46	-	Kaempferol 3-acyldiglusoside-7-glucoside / Quercetin 3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-glucoside / Kaempferol 3-O-hydroxyferuloyldiglusoside-7-O-glucoside
20	46,74	1257,38; <b>658,23</b> ; 628,69; 325,32	-	Não identificado
21	47,31	<b>933,32</b> ; 693,15; 376,41; 178,96	771,20; 609,60; 429,33; 285,33	Kaempferol 3-diglusoside-7-diglusoside/ Kaempferol 3-caffeoyldiglusoside 7-glucoside/ Kaempferol 3-triglusoside-7-glucoside
22	49,66	1139,16	-	Kaempferol 3-sinapoyltriglusoside-7-O-glucoside
23	50,12	<b>1046,68</b> ; 1023,40	-	Não identificado
24	50,69	<b>1272,28</b> ; 980,69; 747,11; <b>711,12</b> ; 635,74; 528,10; 414,80; 391,45; <b>355,59</b>	-	1-O-feruloyl-β-D-glucose
25	50,80	<b>1271,35</b> ; <b>1076,69</b> ; 665,54; 635,41; 391,32; 355,39	-	Não identificado
26	51,00	<b>1331,55</b> ; 977,16; 179,09	1301,29; 1250,53; 1136,77; 977,23; 837,06; 811,31	Não identificado
27	51,23	<b>977,23</b> ; 385,40; 179,03	-	Não identificado
28	51,35	<b>977,36</b> ; 868,92; 830,53; 806,98; 771,12; 421,25; <b>385,53</b> ; 179,03	-	1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose

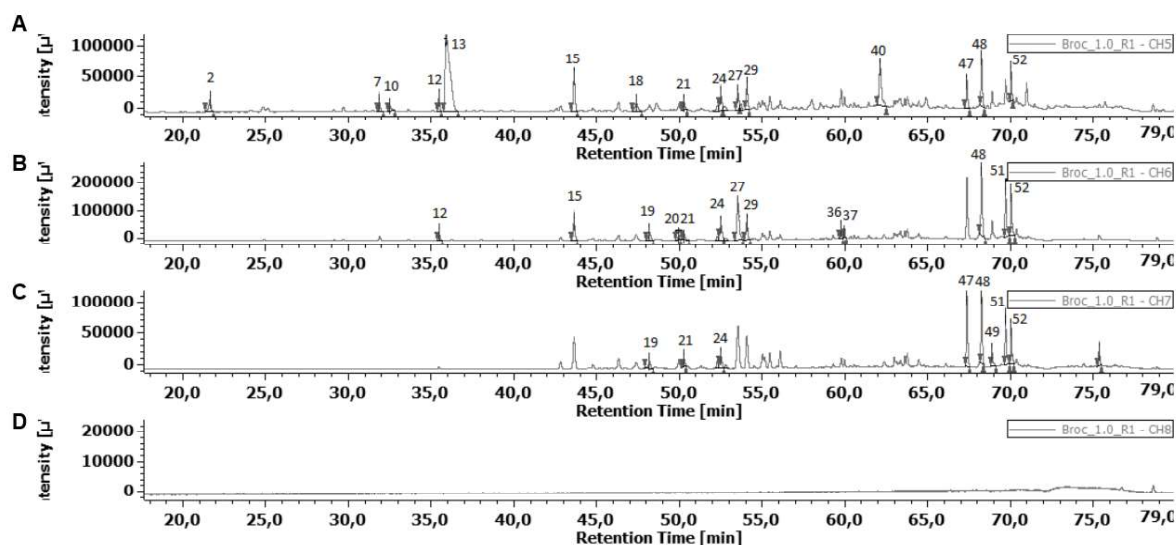
**Tabela 2 (cont.).** Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de brócolo. Todos os compostos apresentam uma identificação presumida. Rt – tempo de retenção.

Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	MS/MS	Composto
29	51,56	<b>743,38</b> ; 421,32; 385,46	-	Não identificado
30	52,09	992,86; 830,87; 807,38; 771,39; 496,43; <b>445,40</b> ; 179,03	-	Genkwanin 5-O-glucoside
31	52,50	982,95; <b>947,36</b> ; 179,03	785,2	Kaempferol-3-O-feruloyldiglusoside-7-O-glucoside
32	53,41	<b>861,00</b> ; 837,59; 801,53; 773,45; 178,96	823,07; 801,07; 697,00; 661,20; 639,20; 534,87; 476,93; 315,13	Não identificado
33	54,56	<b>551,38</b> ; 179,09	-	Ferulic acid-rhamnosylglucose with a 48 amu group
34	57,05	898,99; 844,11; <b>741,25</b> ; 382,20; 322,59	-	Não identificado
35	57,67	<b>871,38</b> ; 179,16	-	Não identificado
36	58,86	1012,82; 891,01; <b>855,48</b> ; 178,96	693,09; 469,42	Não identificado
37	59,09	1193,11; 1109,09; <b>885,49</b> ; 554,31; 179,09	723,10; 499,44	Não identificado
38	59,50	860,80; <b>825,48</b> ; 179,16	-	Não identificado
39	60,75	891,07; <b>885,48</b> ; 581,25; 179,03	-	Não identificado
40	61,89	<b>1095,58</b> ; <b>668,87</b> ; 645,12; 609,33; 364,37; <b>304,23</b> ; 179,29	303,82	Quercetin-3-O-p-coumaroyl-sophorotrioside-7-O-glucoside / Kaempferol 3-O-caffeoyltriglusoside-7-O-glucoside
41	62,77	1361,09; 1091,32; <b>1061,25</b> ; <b>947,42</b> ; 179,09	929,93; 705,13	Não identificado
42	63,25	1477,12; 1091,12; <b>768,53</b> ; 739,32; 635,41; 624,63	-	Não identificado
43	63,46	<b>1345,26</b> ; 947,22; 768,73; 702,13; 672,53	-	Kaempferol 3-disinapoyltriglusoside-7-glucoside
44	63,77	<b>1061,32</b> ; 875,84; 635,47	-	Não identificado
45	64,75	704,80; 669,27; <b>394,31</b> ; 179,03	-	Não identificado

**Tabela 2 (cont.).** Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de brócolo. Todos os compostos apresentam uma identificação presumida. Rt – tempo de retenção.

Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	MS/MS	Composto
46	65,32	1047,28; 919,55; <b>737,73</b> ; 558,37; 179,16	-	Não identificado
47	67,17	851,36; 789,35; <b>753,69</b> ; 178,96	529,04; 289,34	1,2-disinapoylgentiobiose
48	68,04	<b>1446,98</b> ; 759,48; <b>723,69</b> ; 179,03	1205,13; 723,07	1-sinapoyl-2-feruloyldiglucoside
49	68,68	<b>1125,38</b> ; 1076,82; 385,46; 179,03	-	Kaempferol-3-O- hydroxyferuloyldiglucose-7-O- diglucose
50	68,79	<b>1386,77</b> ; 1125,45; 729,54; <b>693,55</b> ; 178,96	499,07; 259,33	1,2-diferuloylgentiobiose
51	70,10	959,6	735,07; 511,33	1,2,2'-trisinapoylgentiobiose
52	70,85	929,39	704,97	1,2'-disinapyl-2- feruloylgentiobiose
53	71,34	899,52	705,07; 675,13	1-sinapoyl-2,2'- diferuloylgentiobiose
54	71,72	1494,61; 965,19; <b>929,33</b> ; 869,45; <b>524,31</b>	-	Não identificado
55	72,13	<b>669,47</b> ; 394,58	-	Não identificado
56	74,97	<b>790,55</b> ; <b>329,65</b> ; 179,03	-	Desulfoglucotropeolin

Apenas foi possível a identificação (presumida) de 23 compostos, por comparação com dados disponíveis na literatura. Para identificação dos restantes compostos seria necessário melhorar as condições de análise de espectrometria de massa de modo a obter padrões de fragmentação para todos os compostos e/ou a utilização de padrões para comparação. Através das identificações da Tabela 2 é possível verificar que o extrato de brócolo é rico em flavonoides (4, 5, 8, 12, 19, 21, 22, 24, 28, 30, 31, 33, 40, 43, 47-53), nomeadamente flavonóis como kaempferol e quercetina, e glucosinolatos (7 e 56). Na Figura 10 encontra-se apresentado o perfil de HPLC do extrato de brócolo obtido a 280 nm, 320 nm, 360 nm e 520 nm.



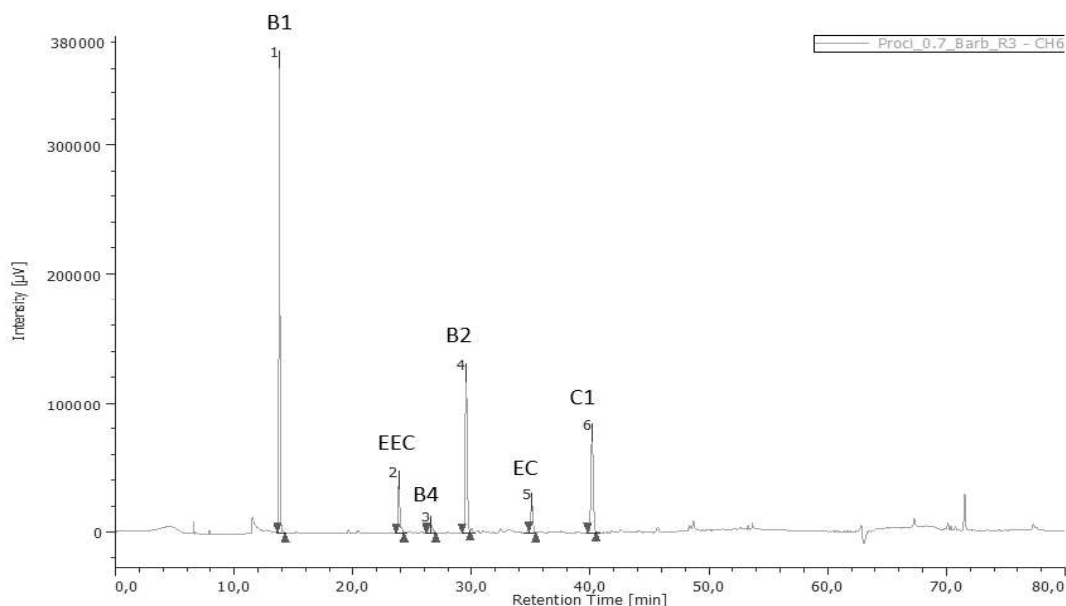
**Figura 10.** Cromatogramas do extrato de brócolo na concentração de 1,0 g/L detetado a 280 nm (A), 320 nm (B), 360 nm (C) e 520 nm (D). A numeração corresponde à numeração atribuída aos compostos na Tabela 2 que foram possíveis de identificar.

A identificação dos compostos nos diferentes comprimentos de onda na Figura 10 permitiu a identificação de compostos das famílias dos ácidos hioxibenzóicos (280 nm), ácidos hidroxicinâmicos (320 nm), flavonas e flavonóis (360 nm). Além disso também permitiu a obtenção de picos com melhor resolução dentro dos diferentes comprimentos de onda.

Para a identificação dos compostos obtidos na Figura 11 teve-se em conta o espectro de massa obtido por LC-MS referido anteriormente (Figura 9). A numeração apresentada corresponde à numeração atribuída aos compostos na Tabela 2 que foram possíveis identificar por este método.

### 4.1.3. Grainha

O extrato de grainha comercial foi analisado tendo em conta a identificação dos compostos por LC-MS (Figura 2A) dos dados obtidos de Soares, Brandão et al. (2019) (Tabela 3), cujo perfil cromatográfico se encontra representado na Figura 11.



**Figura 11.** Cromatograma de extrato de grainha de concentração 0,7 g/L detetado a 280 nm. B1 a B4 – dímeros de procianidina; EEC – trímero de procianidina de epicatequina-epicatequina-catequina; EC – epicatequina; C1 – trímero de procianidina C1.

**Tabela 3.** Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de extrato de grainha. Adaptado de Soares, Brandão et al. (2019). Rt - tempo de retenção.

Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	Composto
1	14,01	577	Procianidina dimétrica B1
2	23,60	865	Trímero de procianidina de epicatequina-epicatequina-catequina (EEC)
3	26,99	577	Procianidina dimétrica B4
4	29,75	577	Procianidina dimétrica B2
5	35,30	289	Epicatequina (EC)
6	40,86	865	Trímero de procianidina C1

O extrato de grainha foi analisado por HPLC (Figura 11) sendo possível identificar polímeros de catequina e epicatequina como dímeros de procianidina (B1 a B4), trímero de procianidina de epicatequina-epicatequina-catequina (EEC), epicatequina (EC) e trímero de procianidina C1 (C1). O extrato utilizado é rico em procianidinas oligoméricas e poliméricas, as quais são visíveis no tipo de cromatografia utilizada.

#### 4.1.4. Ácido tânico

Para identificação dos compostos do ácido tânico recorreu-se ao artigo de Guerreiro, Brandão et al. (2021) (Figura 3A). O perfil de LC-MS encontra-se descrito na Tabela 4

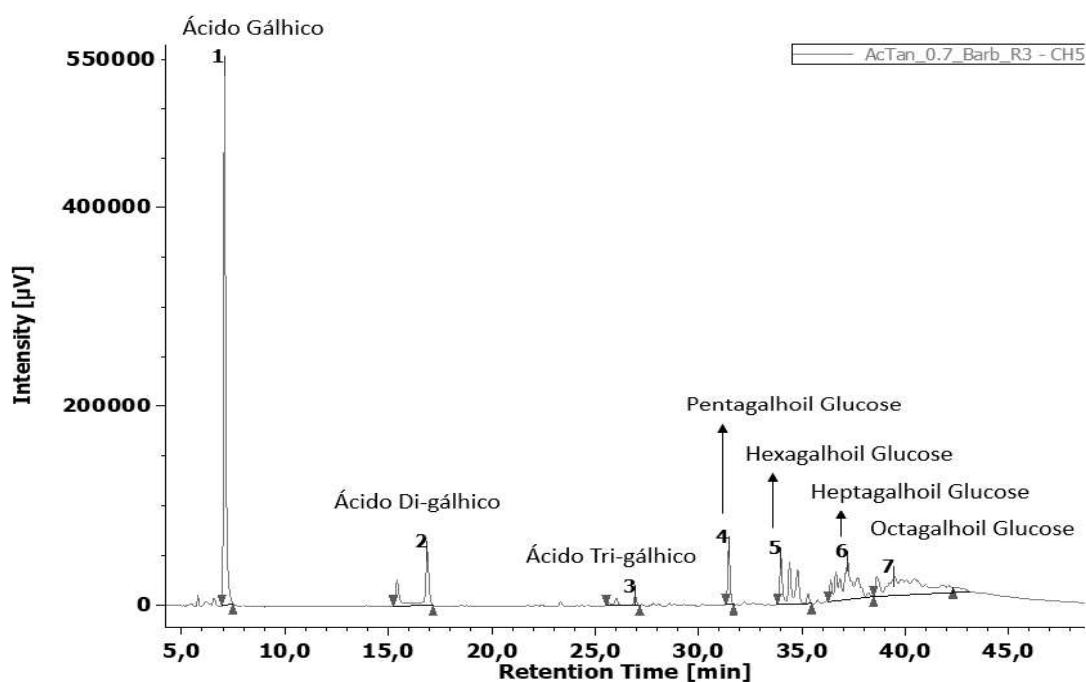


Figura 12. Cromatograma de ácido tânico de concentração 0,8 g/L detetado a 280 nm.

Tabela 4. Identificação dos compostos obtidos por LC-MS de ácido tânico. Adaptado de Guerreiro, Brandão et al. (2021). Rt - tempo de retenção.

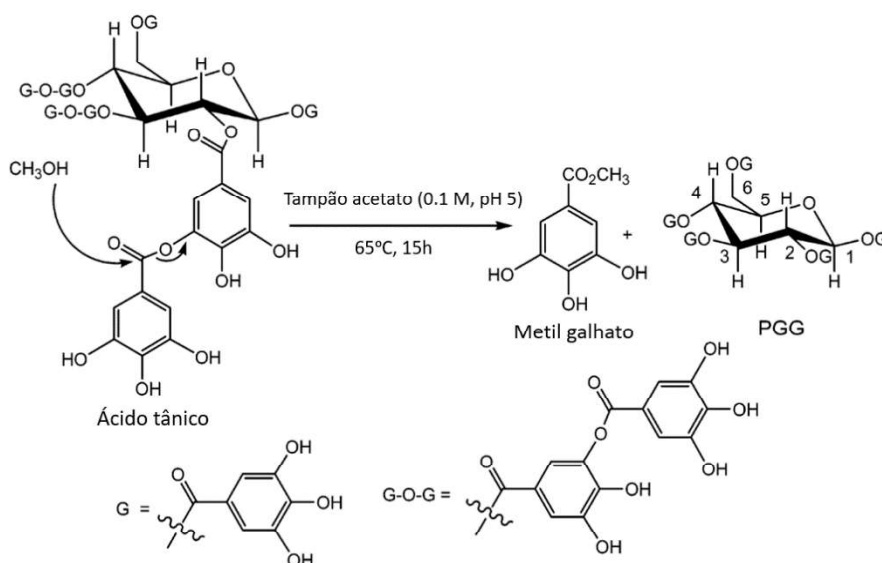
Nº	RT (min)	[M-H] <sup>-1</sup> m/z	Abundância relativa (%)	Composto
1	6,99	169	29,6	Ácido gálgico (AG)
2	9,71-11,02	321	24,2	Ácido di-gálgico (DiAG)
3	15,49-17,81	472	5,7	Ácido tri-gálgico (TriAG)
4	19,99	939	1,7	Pentagalhoil glucose (PGG)
5	22,39-24,63	1091	6,7	Hexagalhoil glucose (HxGG)
6	24,98-26,86	1243	12,0	Heptagalhoil glucose (HpGG)
7	27,48-30,43	1395	20,1	Octagalhoil glucose (OGG)

Na Figura 12 encontra-se apresentado o perfil de HPLC do ácido tânico detetado a 280 nm. Conseguiu-se identificar os ácidos gálgico, di-gálgico e tri-gálgico, e alguns compostos galhoilados, penta-, hexa-, hepta- e octagalhoil glucose.

## 4.2. Caracterização de compostos galhoilados obtidos por hemi-síntese

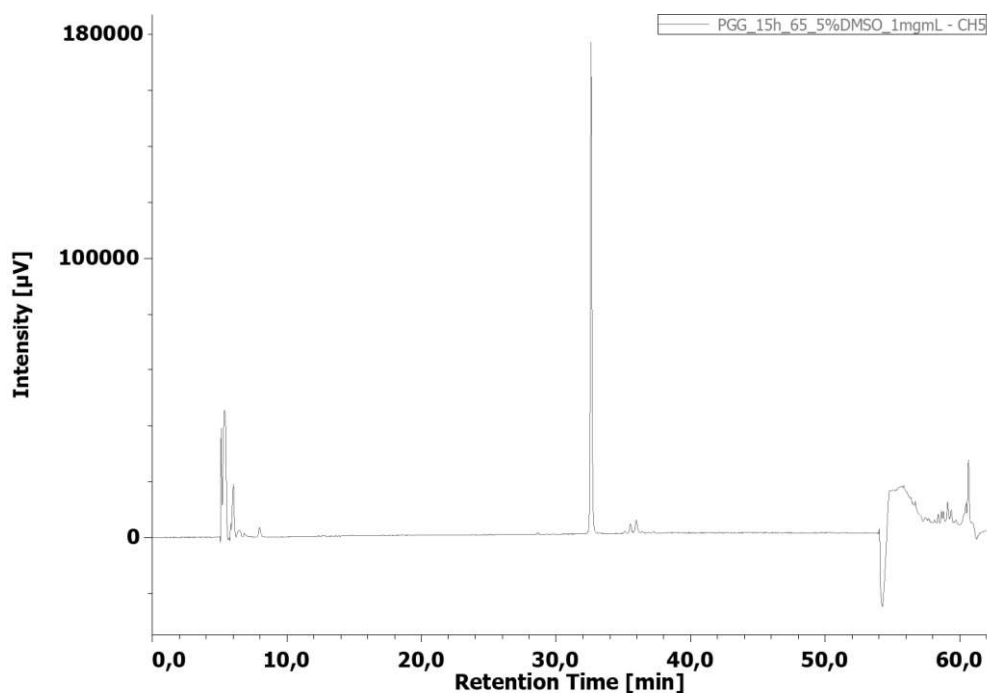
Numa primeira fase, foi pretendido sintetizar PGG, um tanino hidrolisável modelo, conhecido pela sua interação com as proteínas salivares e também como adstringente. A PGG foi sintetizada através da metanólise do ácido tânico em solução tampão com 70% de metanol, a 65°C e durante 15h, seguindo o método de Chen e Hagerman (2004) como já referido. O mecanismo da reação está apresentado na Figura 13.

A formação de PGG foi seguida por HPLC. A sua formação foi seguida por análise da razão entre as áreas dos picos na amostra inicial e na amostra reacional. As diversas etapas de lavagens descritas na secção “Material e métodos” foram também analisadas e observou-se que servem para remoção de subprodutos da reação e obtenção de PGG pura (Figura 14).



**Figura 13.** Metanólise do ácido tânico dando origem a PGG e metil galhato. Adaptado de Chen e Hagerman (2004).





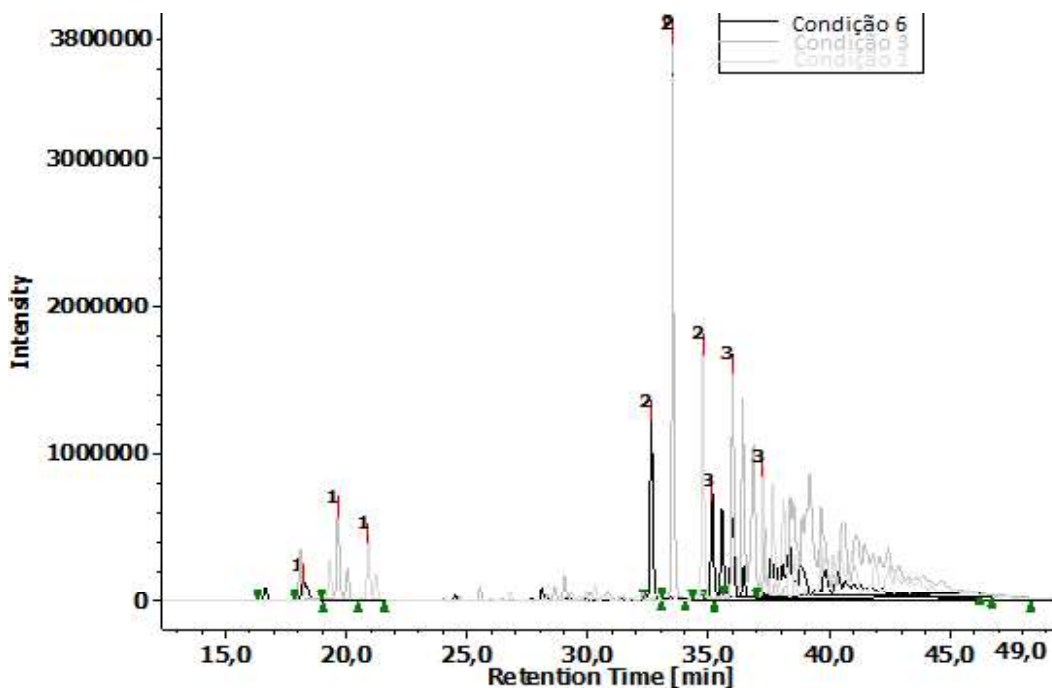
**Figura 14.** Cromatograma obtido por HPLC da reação de hemi-síntese de PGG de 15h após liofilização e diluída em 5% de dimetilsulfóxido.

Com o intuito de obtenção de outros compostos com diferente número de grupos galhoilo, testaram-se diferentes condições de reação: tempo (3h e 7h), temperatura (45°C e 85°C) e percentagem de metanol (50% e 100%) como se encontra descrito na Tabela 5.

**Tabela 5.** Registo das alterações efetuadas no método de Chen e Hagerman (2004) para hemisíntese de PGG e resultados obtidos.

	<b>Tempo (h)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>% Metanol</b>	<b>Resultado</b>
Condição 1	<b>3</b>	65	70	Não formou precipitado
Condição 2	<b>7</b>	65	70	Formou precipitado
Condição 3	7	<b>45</b>	70	Não formou precipitado
Condição 4	7	<b>85</b>	70	Formou precipitado
Condição 5	7	65	<b>50</b>	Formou precipitado
Condição 6	7	65	<b>100</b>	Não formou precipitado

Após a realização de todas as condições descritas na Tabela 5, verificou-se que apenas as condições 1, 3 e 6 não formaram precipitado, mas os seus respectivos cromatogramas apresentavam um pico bem distinto para a PGG (pico 2, Figura 15).



**Figura 15.** Cromatogramas obtidos por HPLC das soluções 1, 3 e 6 respetivamente. Sendo que o pico 1 corresponde a compostos menos galhoilados, o pico 2 corresponde à PGG e o pico 3 corresponde a compostos mais galhoilados.

As restantes condições realizadas (Tabela 5, condições 2, 4 e 5) resultaram num precipitado que foi recuperado por centrifugação e liofilizado, cuja análise de cromatogramas mostra que, assim como acontece com a reação de 15h, após as lavagens obtém-se apenas PGG.

Comparando as áreas dos picos de todos dos cromatogramas obtidos por HPLC, verifica-se que a razão entre a área do pico da PGG e a área dos compostos menos galhoilados de todas as reações é maior que 1 (Tabela 6), mostrando que a PGG apresenta maior concentração relativa. Por outro lado, a razão entre a área do pico da PGG e a área dos compostos mais galhoilados é menor que 1 (Tabela 6), mostrando que a PGG se apresenta em menor concentração relativa. A condição 5 é a única que apresenta razão entre a área do pico da PGG e a área dos compostos mais galhoilados maior que 1, ou seja, a PGG apresenta-se em maior concentração relativa. Por lapso, não foi retirada alíquota da condição 4 após adição de água e evaporação de acetato de etilo.

**Tabela 6.** Registo das áreas das diferentes soluções e razão entre elas.

	Área de picos			Razão entre áreas	
	Menos galhoilados	PGG	Mais galhoilados	PGG/menos galhoilados	PGG/mais galhoilados
Condição 1	9328137	12913823	72118953	1,38	0,18
Condição 2	5550315	13445955	32834424	2,42	0,41
Condição 3	11571683	21715426	140962436	1,88	0,15
Condição 4	-	-	-	-	-
Condição 5	3804232	12685132	12017646	3,33	1,06
Condição 6	4094821	9726217	65738458	2,38	0,15

Deste modo, podemos observar que as condições em que a formação de compostos de maior e menor número de grupos galhoilo mais favorecida são as condições 1 e 3. No entanto, mesmo nestas condições podemos afirmar que apesar do objetivo desta parte do trabalho ter sido a obtenção de compostos com maior e menor número de grupos galhoilo, estas reações são seletivas para a obtenção de PGG como podemos verificar através na Figura 15 em que o pico da PGG é dominante em relação aos restantes picos.

### 4.3. Extração de polissacarídeos da casca da banana

Os polissacarídeos extraídos da casca da banana foram obtidos seguindo o método de Nunes, Saraiva et al. (2008) como já referido. Após liofilização de todos os extratos obtidos, foram calculados os rendimentos de cada fração tendo em conta o peso de AIR inicial (24,2 g) e o peso de cada extração. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 7. As frações de imizadole 16h e 2h foram as únicas que se juntaram numa única solução. Para melhor compreensão optou-se por designar esta solução por imidazole.

**Tabela 7.** Pesos e rendimentos de cada fração de polissacarídeos obtida.

Fração	Peso após liofilização (mg)	Rendimento (%)
Água 16h	1119	4,62
Imidazole	201	0,83
Carbonato de sódio 16h	334	1,38
Carbonato de sódio 2h	88	0,36

A extração mais eficiente corresponde à fração da água 16h, seguida pela fração de carbonato de sódio 16h e imidazole. A extração em que se obteve menor rendimento foi com a fração de carbonato de sódio 2h.

Para obtenção de maior quantidade destes polissacarídeos foi realizada uma nova extração em que se utilizou a mesma massa inicial de casca de banana. Obteve-se uma diferença pouco significativa de AIR (24,6 g), e rendimentos (Tabela 8) muito próximos aos anteriores (Tabela 7).

**Tabela 8.** Novos pesos e rendimentos de cada fração de polissacarídeos obtida por uma segunda extração.

Fração	Peso após liofilização (mg)	Rendimento (%)
Água 16h	1284	5,22
Imidazole	268	1,09
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 16h	511	2,08
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2h	36	0,15

Apenas se verificou uma descida do rendimento na fração obtida por carbonato de sódio 2h por possíveis perdas durante o processo de evaporação e diálise.

Estão em curso trabalhos de caracterização dos polissacarídeos presentes em cada fração, em colaboração com a Universidade de Aveiro.

#### 4.4. Interação de compostos fenólicos, proteínas salivares e polissacarídeos

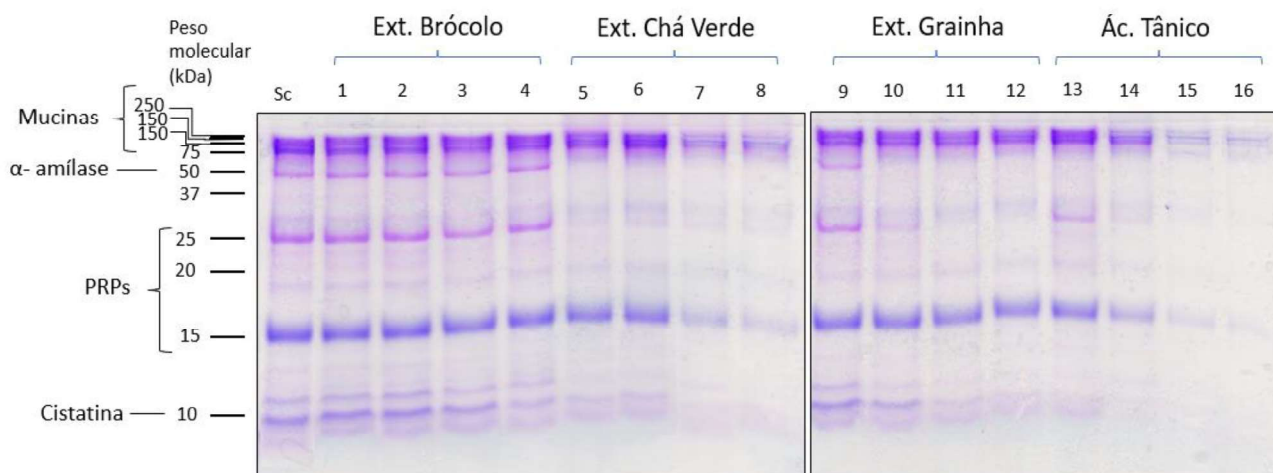
De forma a se observar o efeito dos taninos na interação com a saliva humana, foi necessário efetuar a análise e identificação das proteínas correspondentes ao perfil de HPLC da saliva humana. A saliva humana foi tratada com TFA após a recolha. Este tratamento ácido leva à precipitação de várias proteínas salivares de alto peso molecular, contribui para a diminuição da viscosidade e preserva a composição de proteínas de baixo peso molecular da amostra, visto que o TFA inibe parcialmente a atividade da proteases intrínsecas (Castagnola, Congiu et al., 2001; Messana, Cabras et al., 2004). Este tratamento previne vários problemas como a degeneração da coluna e baixa reprodutibilidade no HPLC que podem estar relacionados com a quantidade de mucinas e outras glicoproteínas de alto peso molecular presentes na saliva (Soares, Vitorino et al., 2011).

Estas interações foram realizadas com uma pool de saliva recolhida numa única recolha, a qual apresentava após o tratamento com TFA as seguintes características

químicas: pH 2.70, força iónica de 4,90 mS/cm e um doseamento de proteína total de 811 µg/mL.

#### 4.4.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos a utilizar

Foram realizados estudos preliminares entre os compostos fenólicos do extrato de brócolo, extrato de chá verde, extrato de grainha e o ácido tânico para determinação da concentração de composto fenólico a utilizar. Os sobrenadantes destas interações, ou seja, as proteínas salivares que não precipitaram com os compostos fenólicos foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE (Figura 16). Para cada interação apresentada foram realizadas duas réplicas. As concentrações utilizadas para este estudo são representativas dos alimentos pois os compostos fenólicos encontram-se normalmente dentro destas gamas de concentrações aquando da ingestão do alimento. Algumas proteínas foram identificadas através dos dados relatados por Gibbins, Yakubov, Proctor, Wilson e Carpenter (2014). A estaterina apresenta um peso molecular de 6 kDa, não podendo ser comparada com este padrão de pesos moleculares.



**Figura 16.** SDS-PAGE da interação de diferentes concentrações de extrato de brócolo (1-4), extrato de chá verde (5-8), extrato de grainha (9-12) e ácido tânico (13-16) com saliva. Sc corresponde a saliva controlo.

As primeiras 4 *lanes* (1-4) referem-se à interação de concentrações crescentes do extrato de brócolo com saliva, sendo as concentrações finais de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 g/L, respetivamente. Como se pode observar existe uma diminuição mais acentuada da

intensidade das bandas correspondentes às cistatinas na *lane* 4 que corresponde à concentração de 1,0 g/L de extrato de brócolo. Isto indica que ocorreu maior precipitação de proteínas a esta concentração de extrato de brócolo, devido à formação de complexos insolúveis com os compostos fenólicos que foram removidos por centrifugação. A Figura 16 demonstra que interação do extrato de brócolo indica ser seletiva para as proteínas de baixo peso molecular, nomeadamente das de 10 kDa (cistatinas).

As *lanes* 5 a 8 correspondem à interação do extrato de chá verde com saliva, nas concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L, respetivamente. Verifica-se que na concentração mais baixa de 0,4 g/L (*lane* 5) há precipitação de grande parte das proteínas salivares presentes na saliva controlo (*lane* sc) devido à diminuição da intensidade das bandas, sendo que a interação é cada vez mais evidente com o aumento da concentração. Ao contrário do que se observou na interação com extrato de brócolo, o extrato de chá verde não apresenta especificidade, afetando todas as proteínas salivares.

As *lanes* 9 a 12 correspondem à interação do extrato de grainha com saliva nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 g/L, respetivamente. Na concentração de 0,3 g/L (*lane* 10) já se verifica uma precipitação acentuada de proteínas salivares, sendo esta ainda maior nas concentrações de 0,5 e 0,7 g/L. Este extrato mostrou ser seletivo para as proteínas de 10 kDa (cistatinas), 20-25 kDa (PRPs) e 50 kDa ( $\alpha$ -amilases).

As últimas *lanes* (13-16) correspondem à interação da saliva com o ácido tânico nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5 e 0,8 g/L, respetivamente. Na concentração de 0,1 g/L verifica-se precipitação das proteínas salivares, sendo que nas seguintes concentrações essa precipitação é mais acentuada levando à depleção praticamente total de todas as proteínas salivares. Este composto foi o que demonstrou maior precipitação das proteínas salivares.

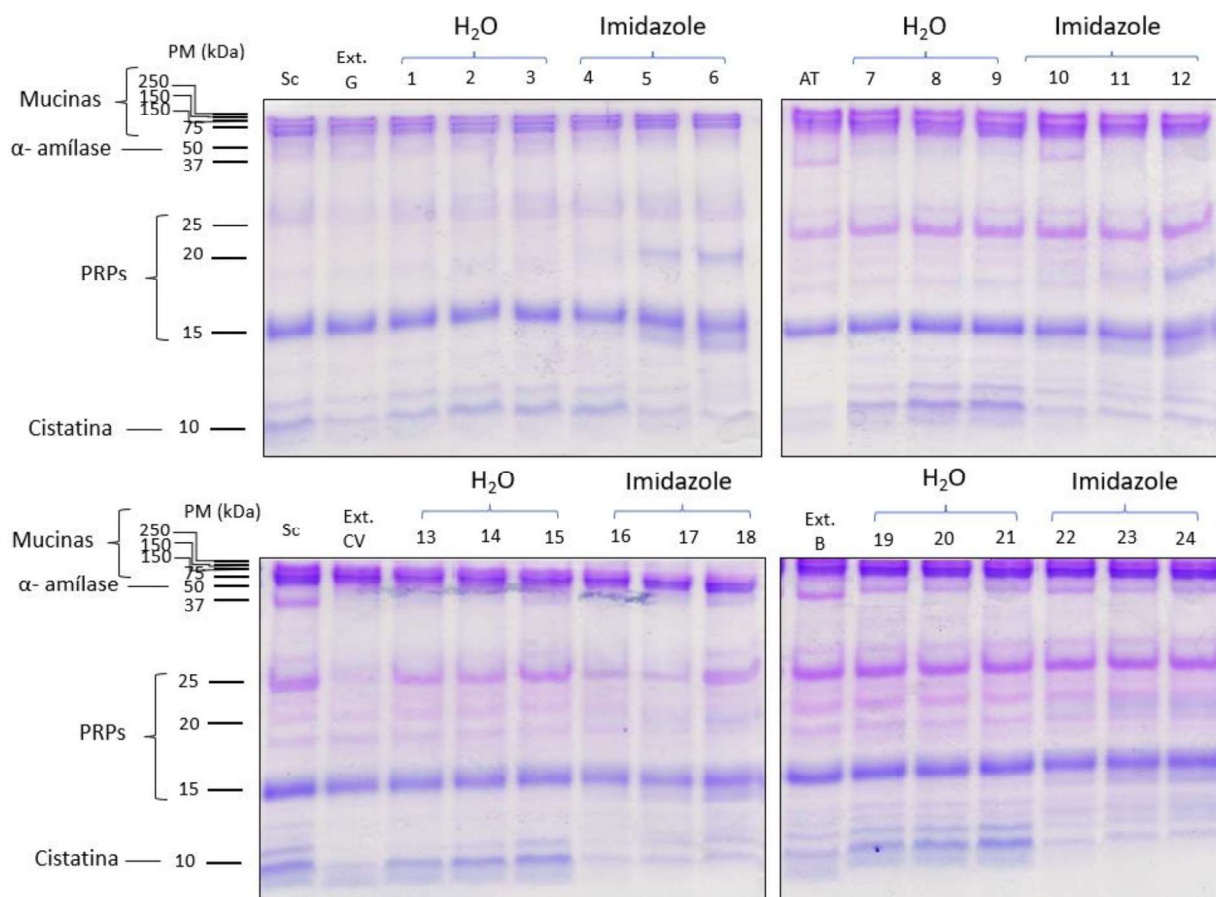
Assim, tendo em conta os resultados obtidos foram escolhidas as concentrações que precipitassem cerca de 70% das proteínas salivares (1,0 g/L de extrato de brócolo; 0,4 g/L de extrato de chá verde; 0,5 g/L de extrato de grainha e 0,1 g/L de ácido tânico) para testar a influência dos polissacarídeos da casca da banana na interação das proteínas salivares-compostos fenólicos. Foram escolhidas estas concentrações, visto que quantidades demasiado baixas de compostos fenólicos não iriam levar a precipitações significativas das proteínas salivares (Soares, Mateus, & de Freitas, 2012a).. Assim,

tendo em conta os níveis de precipitação apresentados, pode-se dizer que estes extratos/compostos podem contribuir para a percepção da adstringência.

Verificando o efeito das estruturas dos compostos fenólicos estudados neste trabalho na precipitação das diferentes famílias de proteínas salivares, concluiu-se que o extrato de brócolo e o extrato de grainha apresentam seletividade para certas famílias de proteínas.

#### **4.4.2. Efeito dos polissacarídeos na interação proteínas salivares-compostos fenólicos**

Tendo em conta as concentrações escolhidas, testou-se a influência dos polissacarídeos extraídos da casca da banana com água 16h, imidazole, carbonato de sódio 16h e carbonato de sódio 2h. Os polissacarídeos foram estudados nas concentrações finais de 1,0 g/L, 2,0 g/L e 3,0 g/L. A Figura 17 apresenta os resultados das interações entre saliva e compostos fenólicos (extrato de grainha, ácido tânico e extrato de chá verde, extrato de brócolo) sem a presença de polissacarídeos (*lanes* Ext. G, AT, Ext. CV e Ext. B, respetivamente) e na presença de concentrações crescentes de polissacarídeos extraídos com água 16h (*lanes* 1 – 3, 7 – 9, 13 – 15 e 19 - 21) e imidazole (*lanes* 4 – 6, 10 – 12, 16 – 18 e 22 - 24).



**Figura 17.** SDS-PAGE da interação de saliva com extrato de grainha (1-6), ácido tânico (7-12), extrato de chá verde (13-18) e extrato de brócolo (19-24) na ausência e presença de polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole. Sc corresponde a saliva controle, Ext. G é a interação de saliva com extrato de grainha de concentração 0,5 g/L, AT é a interação de saliva com ácido tânico de concentração 0,1 g/L, Ext. CV é a interação de saliva com extrato de chá verde de concentração 0,4 g/L e Ext. B é a interação de saliva com extrato de brócolo de concentração 1,0 g/L.

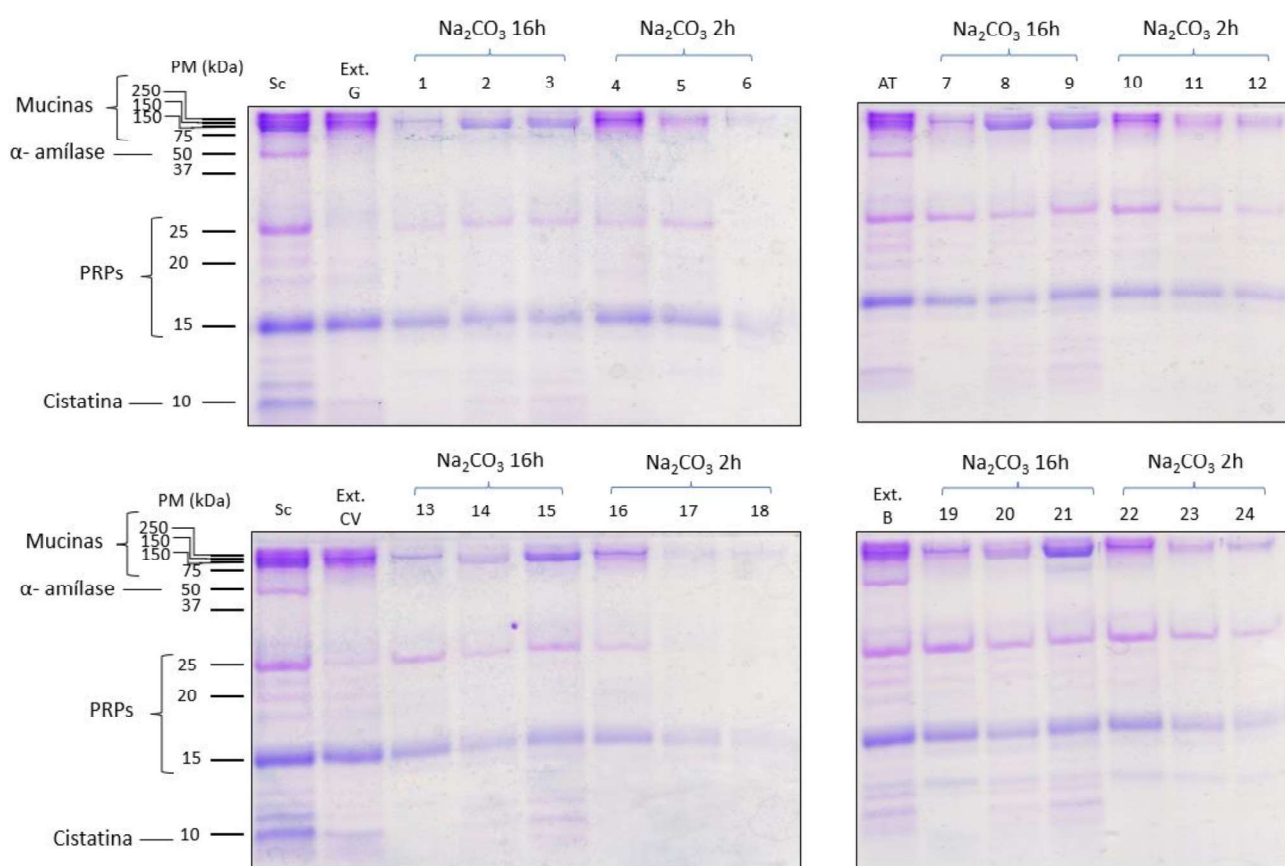
Assim, comparando as interações entre saliva e compostos fenólicos sem a presença de polissacarídeos e na presença de polissacarídeos, verifica-se de uma forma geral que estes polissacarídeos impedem a precipitação das proteínas salivares. Esta inibição da precipitação é mais acentuada nas interações com o ácido tânico e extrato de chá verde, extratos ricos em compostos com grupos galhoil, e para os polissacarídeos isolados com imidazole. Para além disso, é também notório um efeito mais evidente nas proteínas de baixo peso molecular, nomeadamente cistatinas e PRPs.

Por outro lado, a presença de polissacarídeos extraídos com imidazole presentes nas *lanes* 4 – 5, 10 – 12, 16 – 18 e 22 – 24 (Figura 17), para além de inibir a precipitação de proteínas de baixo peso molecular (cistatinas e PRPs), proporciona também a inibição da precipitação de proteínas de peso molecular entre os 75 kDa e 25 kDa (zona das  $\alpha$ -amílases). No extrato de brócolo apenas se verifica redução da precipitação nas



proteínas de baixo peso molecular (cistatinas e PRPs), em que é visível um aumento da intensidade das bandas em comparação com a *lane* Ext. B.

A Figura 18 apresenta os resultados das interações entre saliva e compostos fenólicos (extrato de grainha, ácido tânico e extrato de chá verde, extrato de brócolo) sem a presença de polissacarídeos (*lanes* Ext. G, AT, Ext. CV e Ext. B, respetivamente) e na presença de concentrações crescentes de polissacarídeos extraídos com carbonato de sódio 16h (*lanes* 1 – 3, 7 – 9, 13 – 15 e 19 - 21) e carbonato de sódio 2h (*lanes* 4 – 6, 10 – 12, 16 – 18 e 22 - 24).



**Figura 18.** SDS-PAGE da interação de polissacarídeos extraídos com carbonato de sódio 16h e 2h com extrato de grainha (1-6), ácido tânico (7-12), extrato de chá verde (13-18) e extrato de brócolo (19-24) e saliva. Sc corresponde a saliva controlo, Ext. G é a interação de saliva com extrato de grainha de concentração 0,5 g/L, AT é a interação de saliva com ácido tânico de concentração 0,1 g/L, Ext. CV é a interação de saliva com extrato de chá verde de concentração 0,4 g/L e Ext. B é a interação de saliva com extrato de brócolo de concentração 1,0 g/L.

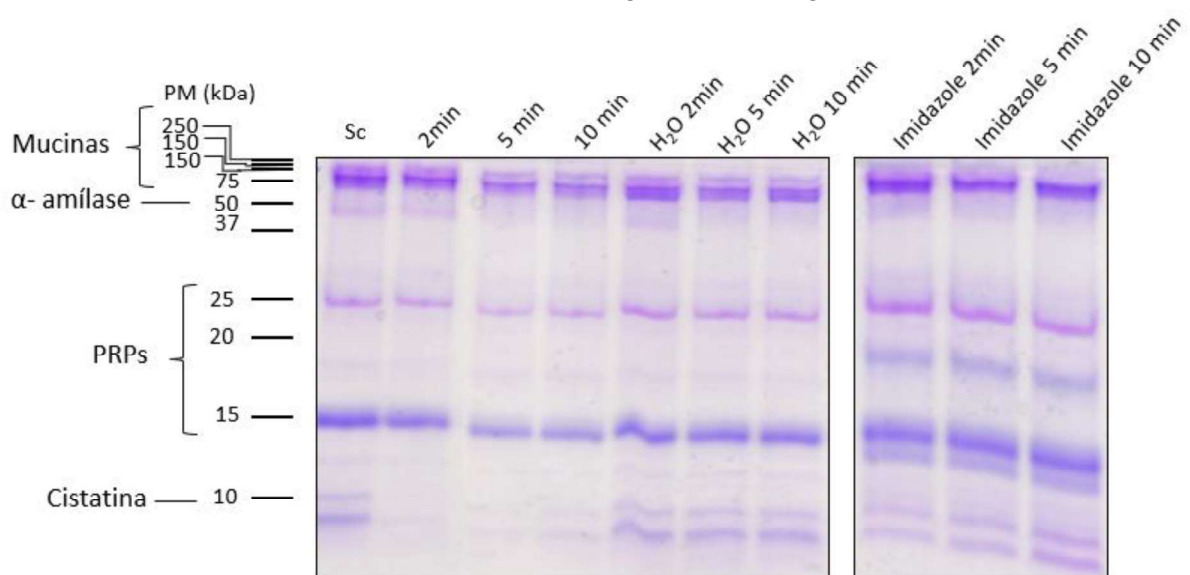
Através da comparação das *lanes* com e sem a presença de polissacarídeos, verifica-se uma diminuição da intensidade das bandas pelo que ocorreu um aumento da precipitação de proteínas salivares na presença de polissacarídeos extraídos com carbonato de sódio 16h (*lanes* 1-3, 7-9, 16-18 e 22-23), principalmente na interação com

ácido tânico e com polissacarídeos extraídos com carbonato de sódio 2h (*lanes 4 – 5, 10 – 12, 16 – 18 e 22 – 24*). É bastante evidente o efeito de recuperação nas proteínas de baixo peso molecular (cistatinas), mas também na zona do 25 kDa (PRPs) para o extrato de grainha e de chá verde com a fração de carbonato de sódio 16h. Seriam necessários mais estudos para verificar quais polissacarídeos estão presentes nestas frações e como estes interagem com as proteínas salivares, de forma a perceber este aumento de precipitação proteica na presença de polissacarídeos.

Em resumo, comparando a eficácia dos polissacarídeos, verifica-se que as frações extraídas com água 16h e imidazole são mais eficientes no impedimento da interação dos compostos fenólicos com as proteínas salivares, visto que se observa uma recuperação de proteínas mais evidente. Comparando estes polissacarídeos observa-se que parece existir uma seletividade dos polissacarídeos extraídos com água 16h para inibir a precipitação de cistatinas, enquanto a fração de imidazole é mais eficiente na inibição de precipitação das PRPs.

#### 4.4.3. Efeito dos polissacarídeos na interação das proteínas salivares com uma matriz alimentar

Além da interação com o extrato de chá verde, também foi testada a influência dos polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole na matriz da infusão do chá verde. Foram efetuados testes com diferentes tempos de incubação, 2, 5 e 10 min e analisados por SDS-PAGE. Os resultados encontram-se registados na Figura 19.



**Figura 19.** SDS-PAGE da interação de polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole com infusão de chá verde com diferentes tempos de incubação (2, 5 e 10 min) e saliva. Sc corresponde a saliva controlo.

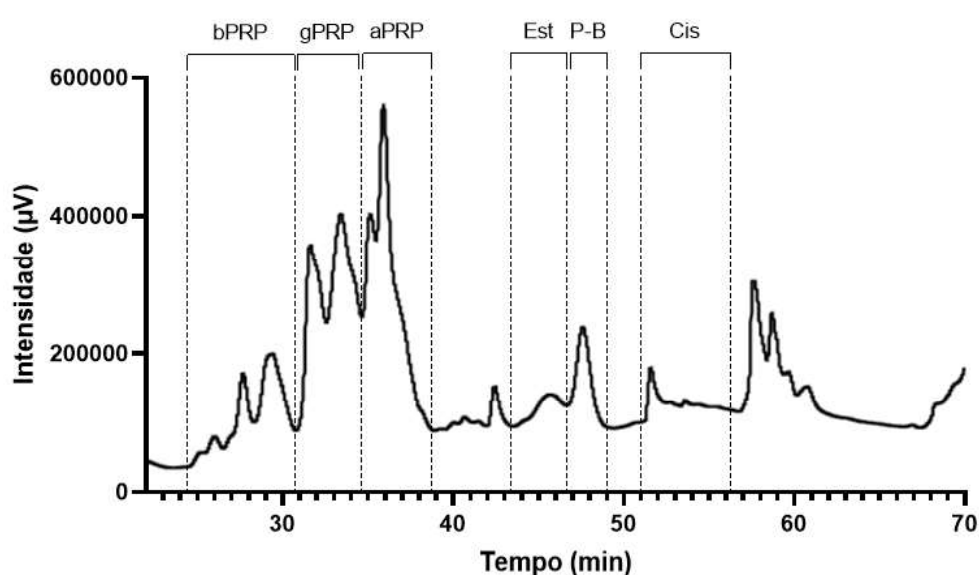
Analisando a Figura 19 verifica-se que ocorre precipitação de proteínas salivares independentemente do tempo de incubação da saqueta de chá verde, visto que se observa uma diminuição gradual das bandas aos 2 min, 5 min e 10 min. Quando dissolvidos na infusão os polissacarídeos obtidos com água 16h e imidazole e posteriormente colocados a interagir com saliva, verificou-se a inibição da precipitação das proteínas de baixo peso molecular (cistatinas e PRPs), sendo mais evidente o efeito na presença de polissacarídeos extraídos com imidazole.

Comparando o efeito destes polissacarídeos na infusão e no extrato de chá verde, nota-se que na presença da fração da água 16h as proteínas que são recuperadas são as cistatinas em ambos aos casos. Já a fração de imidazole, é mais seletiva para as PRPs mas demonstra ser mais eficiente na interação com extrato de chá verde, onde se verifica maior intensidade das bandas na presença destes do que nos polissacarídeos extraídos com água 16h.

## 4.5. Proteínas salivares que interagem com os compostos fenólicos

### 4.5.1. Identificação de proteínas salivares

O cromatograma da saliva controlo e a identificação das diferentes famílias de proteínas salivares encontram-se apresentado na Figura 20.

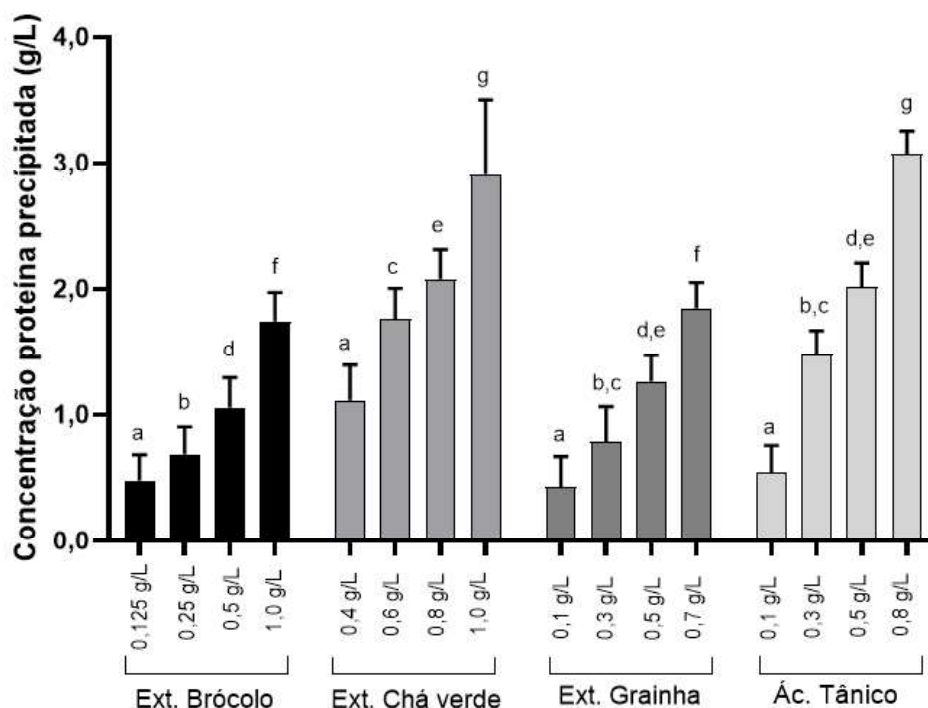


**Figura 20.** Cromatograma de controlo de saliva humana detetado a 214 nm, com identificação das principais famílias de proteínas salivares.

A identificação das principais famílias das proteínas salivares foi baseada em estudos anteriores por Soares, Vitorino et al. (2011). O perfil típico da saliva humana é dividido em PRPs, que engloba bPRPs, gPRPs e aPRPs, estaterina (Est), péptido P-B (P-B) e cistatinas (Cis) (Soares, Vitorino et al., 2011).

#### 4.5.2. Identificação das famílias de proteínas salivares precipitadas pela interação com os extratos

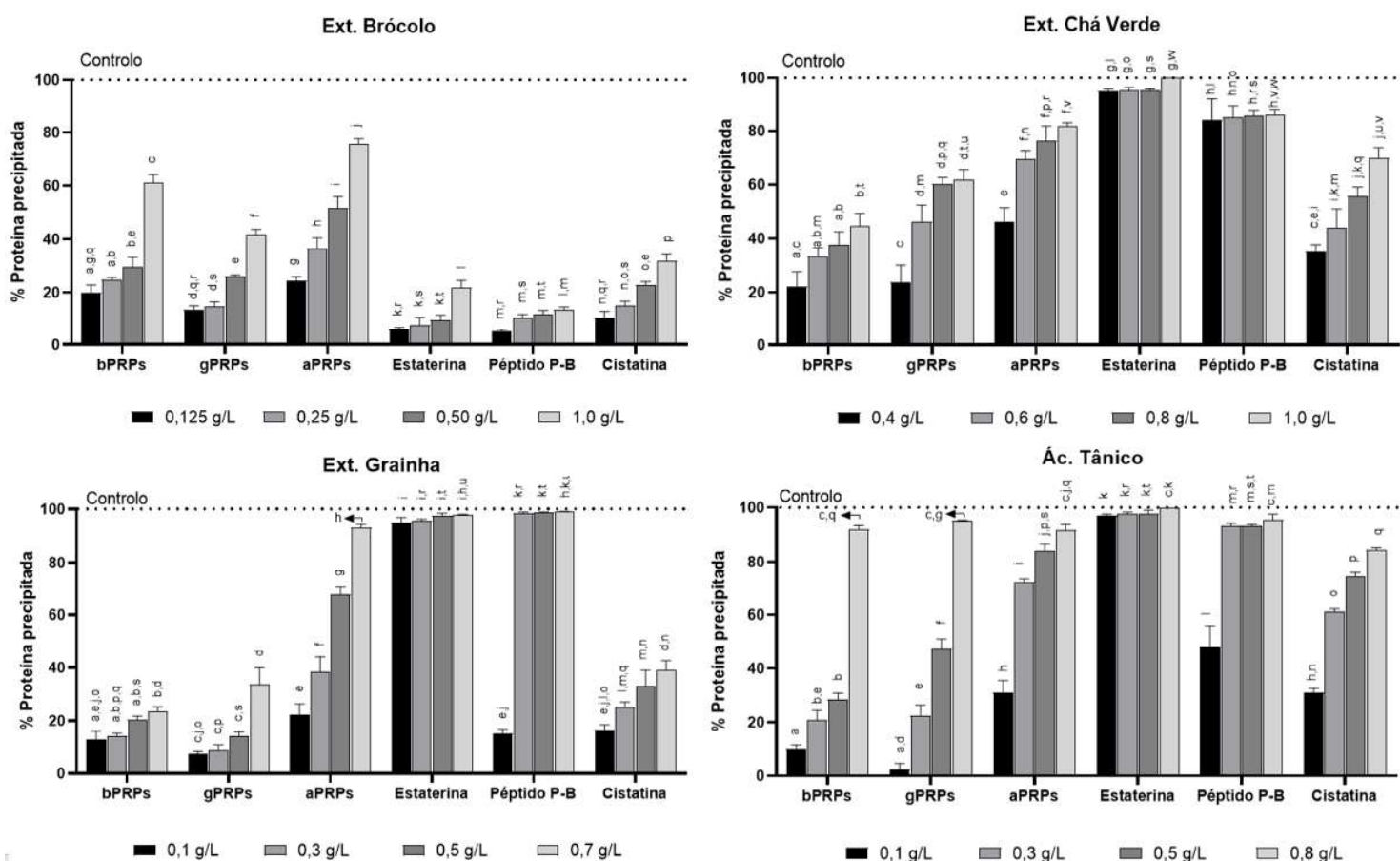
Com a observação de diminuição de proteínas salivares por SDS-PAGE após a interação de saliva humana com os extratos em estudo, recorreu-se também a uma análise por HPLC dos sobrenadante, com o objetivo de quantificar a interação das diferentes famílias de proteínas salivares que interagiram com os compostos fenólicos. Para determinar a quantidade de proteína precipitada foi subtraída a quantidade de proteína que permaneceu em solução à condição controlo (saliva controlo), que apresenta a quantidade máxima de proteínas na saliva utilizada neste estudo. A Figura 21 apresenta a concentração total de proteína que interagiu para concentrações crescentes de cada extrato.



**Figura 21.** Representação gráfica da concentração de proteínas salivares que interagiram com extrato de brócolo, extrato de chá verde, extrato de grainha e ácido tânico em concentrações crescentes. Os dados foram normalizados para a concentração do controlo. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogêneos.

Observando a Figura 21 verifica-se que o extrato de brócolo e o extrato de grinha precipitam a mesma concentração de proteína total, sendo que o mesmo acontece para o extrato de chá verde e o ácido tânico. O mesmo não se verifica por SDS-PAGE, em que, para as proteínas de baixo peso molecular, o extrato de grinha apresenta maior precipitação que o extrato de brócolo e o ácido tânico apresenta maior efeito do que o extrato de chá verde apesar de estarem formados principalmente por taninos galhoilados. Tendo em conta a concentração mais alta dos extratos, constata-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o extrato de brócolo e o extrato de grinha, e o extrato de chá verde e o ácido tânico. Assim podemos concluir que estes dois últimos extratos fenólicos apresentaram maior indução de precipitação de proteínas salivares totais.

Também foi avaliada a influência da concentração de extratos fenólicos nas diferentes famílias de proteínas salivares (Figura 22).



**Figura 22.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC das diferentes famílias de proteínas salivares que interagiram com extrato de brócolo, de chá verde e de grinha e com ácido tânico nas diferentes concentrações. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem da saliva controlo. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogêneos.

Referente à interação de saliva com extrato de brócolo (Figura 22), verifica-se que as aPRPs são as proteínas que mais interagiram com os compostos fenólicos, precipitando 76% de proteína na concentração mais alta (1,0 g/L). Nestas proteínas o efeito da concentração é significativo, podendo-se afirmar que com o aumento da concentração, aumenta a percentagem de proteína precipitada. Por outro lado, a estaterina e o péptido P-B foram as famílias de proteínas salivares que menos precipitaram, sem se observar o efeito da concentração, exceto na estaterina, em que existiu um aumento significativo da precipitação na concentração de 0,5 g/L.

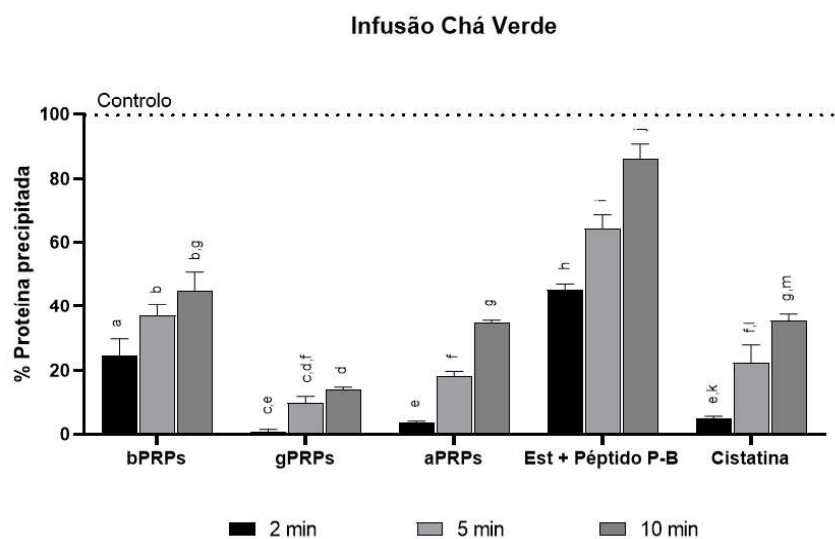
Em relação à interação da saliva com extrato de chá verde (Figura 22), observa-se que a estaterina e o péptido P-B foram as famílias de proteínas mais afetadas, precipitando 100% e 86% respetivamente para a concentração mais alta (1,0 g/L), e não se verificou diferenças significativas com o aumento da concentração. Dentro da família das PRPs, as aPRPs foram as proteínas mais precipitadas, sendo significativamente diferentes das bPRPs e gPRPs. Estas duas últimas são iguais do ponto de vista estatístico em todas as concentrações exceto na concentração de 0,8 g/L. Por fim, na concentração de 1,0 g/L verifica-se que as aPRPs, péptido P-B e cistatinas atingiram níveis estatisticamente similares.

Assim como se verificou na interação do extrato de chá verde, o extrato de grainha (Figura 22) afetou mais a estaterina e o péptido P-B, precipitando 98% e 99% respetivamente para concentração mais alta (0,7 g/L), sem existir um efeito da concentração exceto para a concentração de 0,1 g/L do péptido P-B. Na família das PRPs, as aPRPs foram as mais afetadas, atingindo níveis semelhantes da estaterina e do péptido P-B na concentração mais alta. Por outro lado, as bPRPs e as gPRPs apresentaram igualdade significativa entre elas em todas das concentrações, mas diferiram ambas das aPRPs.

Por fim, analisando a interação do ácido tânico ao nível da precipitação de proteínas salivares (Figura 22), observa-se que, assim como nas interações com extratos de chá verde e de grainha, as estaterina e o péptido P-B foram as famílias de proteínas que mais interagiram, precipitando 100% e 95,5% respetivamente para a concentração mais alta (0,8 g/L). As diferenças de precipitação foram anuladas com o aumento da concentração em ambas estas duas proteínas, com exceção da concentração de 0,1 g/L no péptido P-B, em que observa um aumento significativo da percentagem de proteína precipitada. Na família das PRPs, assim como relatado anteriormente, as aPRPs foram as proteínas mais afetadas, apesar de na concentração de 0,8 g/L

apresentarem níveis similares com as restantes PRPs, assim como com a estaterina e o péptido P-B. Ainda de verifica uma similaridade entre as bPRPs, aPRPs e cistatinas também na concentração mais alta.

Comparando estas interações, observa-se que, em relação aos outros extratos, o extrato de brócolo é o que apresenta menor precipitação de proteínas salivares. Como já referido anteriormente, este extrato é rico em flavonóis, que demonstra ser menos reativo com a proteínas salivares, mas apresenta maior influência nas PRPs do que nas restantes famílias ao contrário do que se observou em SDS-PAGE, cuja família mais afetada é a das cistatinas. O ácido tânico, o extrato de grainha e o extrato de chá verde apresentam padrões de precipitação similares para as famílias das aPRPs, estaterina e péptido P-B, o que indica que os flavan-3-óis e moléculas com grupos galhoilo interagem mais com proteínas salivares. Além disso, ainda de verifica que na família das PRPs, as aPRPs foram as mais afetadas em todos os extratos/composto.



**Figura 23.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC das diferentes famílias de proteínas salivares que interagiram com infusão de chá verde com tempos de incubação de 2, 5 e 10 min. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem da saliva controlo. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos homogéneos.

Na interação da infusão de chá verde (Figura 23) observa-se que as famílias da estaterina e péptido P-B foram as mais precipitaram (86%) no tempo de incubação mais alto (10 min). Da família das PRPs observou-se que, ao contrário do que está representado nas interações anteriores, as bPRPs são as mais precipitadas. Por outro lado, as gPRPs e aPRPs apresentam níveis similares para 2 e 5 min. Por fim constata-se que as bPRPs, aPRPs e cistatinas, aos 10 min atingem níveis estatisticamente similares. As infusões de chá têm por base a extração de vários compostos de folhas

trituradas através da utilização de água quente. Assim, o aumento do tempo de incubação significa uma maior extração desses compostos.

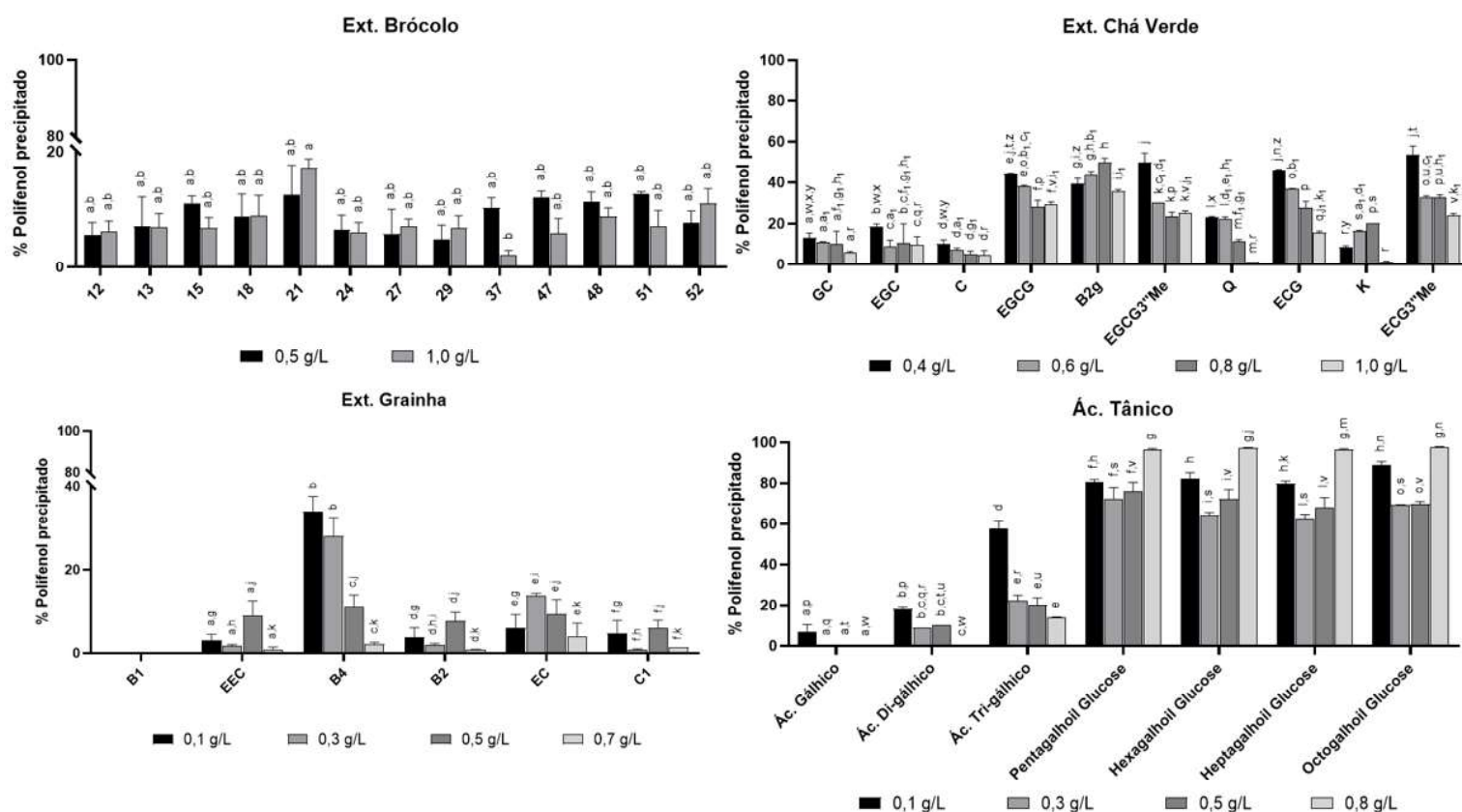
Comparando esta interação com o extrato de chá verde, rico em compostos fenólicos, verifica-se, para a concentração mais alta, que existe maior precipitação de proteínas salivares no extrato. A estaterina e o péptido P-B são as famílias mais afetadas em ambos os casos, mas existe uma diminuição da precipitação das gPRPs e aPRPs, não sendo estas as PRPs mais afetadas.

Por fim, comparando estes resultados obtidos por HPLC das diferentes famílias de proteínas salivares, com os resultados obtidos por SDS-PAGE, verifica-se que aquilo que foi observado previamente em gel é concordante com os perfis de HPLC.

#### **4.6. Compostos fenólicos que interagiram com as proteínas salivares**

Os sobrenadantes resultantes após remoção dos agregados insolúveis, estudado anteriormente, foram analisados por HPLC para quantificar também os compostos fenólicos que precipitaram com as proteínas salivares. Assim como descrito anteriormente, a quantidade não precipitada foi subtraída ao respetivo controlo de cada fração para determinação da quantidade precipitada de composto fenólico. Na Figura 27 estão representadas as percentagens de cada composto fenólico de cada extrato estudado, que foram precipitadas após interação com saliva humana. Os valores foram normalizados para as concentrações iniciais de cada composto nas diferentes concentrações de extrato.





**Figura 24.** Percentagem de área dos picos obtidos por HPLC dos diferentes compostos fenólicos precipitados de extrato de brócolo, de chá verde e de grainha e ácido tânico após interação com saliva humana, nas diferentes concentrações. Os dados obtidos foram normalizados para a percentagem inicial de cada concentração. Os dados apresentados correspondem à média de três réplicas independentes e as barras de erros indicam SEM. Letras iguais identificam grupos não-significativamente diferentes ( $p < 0.5$ ).

No extrato de brócolo (Figura 24), apenas se analisou os dados referentes às interações com concentrações de 0,5 e 1,0 g/L pois nas concentrações mais baixas as quantidades precipitadas de compostos fenólicos estavam fora do limite de deteção do equipamento utilizado para esta parte do estudo. Além disso, só foram analisados os picos do cromatograma (Figura 10) que apresentaram diferenças com os controlos.

Assim, verifica-se que no extrato de brócolo, o composto que mais precipitou foi o 21 (Tabela 2), que corresponde presumidamente a Kaempferol 3-diglucoside-7-diglucoside, Kaempferol 3-caffeoyldiglucoside 7-glucoside ou Kaempferol 3-triglucoside-7-glucoside, atingindo o seu máximo (17%) na concentração 1,0 g/L. Este composto não apresenta diferenças significativas entre as duas concentrações. De todos os compostos analisados apenas o 21 e o 37 demonstram diferenças significativas na concentração de 1,0 g/L. Na interação do extrato de brócolo com a saliva humana, a precipitação de proteínas salivares era menor em relação aos outros extratos, mas

significativa, o que demonstra que para atingir aquela precipitação de proteínas salivares são necessárias quantidades residuais de compostos fenólicos do brócolo.

No extrato de chá verde (Figura 24), o B2g, EGCG e ECG foram os compostos fenólicos que mais precipitaram as proteínas salivares, atingindo o seu máximo na concentração de 0,8 g/L (50%), 0,4 g/L (44%) e 0,4 g/L (46%) respetivamente. Nas concentrações de 0,4 e 0,6 g/L verifica-se que estes três compostos não apresentam diferenças significativas entre eles, atingindo valores de precipitação similares nestas concentrações. Por outro lado, os compostos galhocatequina (GC), epigalhocatequina (EGC) e catequina (C) apresentam valores estatisticamente similares para todas as concentrações.

Os compostos EGCG e ECG são taninos condensados que diferem entre si pela adição de um grupo metil (-OH) na EGCG. Ambos são formados por uma unidade de (-)-epicatequina ligada a um grupo galhoilo. Estes dois compostos apresentam similaridade entre si nas diferentes concentrações, o que está de acordo com estudos anteriores por Charlton, Baxter et al. (2002), que reportaram que a afinidade de ligação dos compostos EGCG e ECG eram aproximadamente iguais.

No extrato de grainha (Figura 25), o composto fenólico que mais interagiu com a saliva humana foi a procianidina dimérica B4, atingindo a percentagem máxima na concentração de 0,1 g/L (34%). A procianidina dimérica B1 não apresentou diferenças com o controlo evidenciado não ter interação com as proteínas salivares em todas as concentrações de extrato de grainha. Os restantes compostos, procianidina trimérica de epicatequina-epicatequina-catequina (EEC), procianidina dimérica B2, epicatequina (EC) e procianidinas trimérica C1, não apresentam diferenças significativas entre concentrações. Para concentrações mais altas de extrato (0,5 e 0,7 g/L) a procianidina dimérica B4 atinge níveis de precipitação similares com os restantes compostos.

de Freitas e Mateus (2001) observaram que o grau de interação dos compostos fenólicos com as proteínas salivares aumenta com grau de polimerização, ou seja, estes autores reportaram que a interação era maior para a procianidina trimérica C1 do que para as procianidinas diméricas e monoméricas. O mesmo não se verificou neste estudo, sendo que o composto que mais interagiu foi o dímero B4. Estes resultados salientam a importância dos estudos em que os compostos fenólicos se encontram simultaneamente presentes, como neste estudo, e mais próximo de uma matriz alimentar, em detrimento dos estudos efetuados com compostos puros e isolados.

No ácido tânico (Figura 24), os compostos mais precipitados foram os que possuem maior número de grupos galhoilo, penta-, hexa-, hepta- e octagalhoil glucose, atingindo o máximo de precipitação na concentração de 0,8 g/L (96%, 97%, 97% e 98% respetivamente). Estes compostos não apresentam diferenças significativas entre si em qualquer umas das concentrações. Por outro lado, o ácido gálgico não interagiu nas concentrações de 0,3; 0,5 e 0,8 g/L assim como o ácido di-gálgico não interagiu na concentração de 0,8 g/L. Estes dois últimos apresentam valores estatisticamente similares entre eles.

J. R. Bacon e M. J. C. Rhodes (2000) reportaram que compostos fenólicos maiores e mais complexos apresentam maior interação com as proteínas salivares visto que têm a possibilidade de formar múltiplas ligações com proteínas adjacentes, enquanto que compostos fenólicos mais simples, como é o caso dos ácidos gálgico, di-gálgico e tri-gálgico, apenas podem se ligar a uma única proteína. Também como foi referido pelos mesmos autores, as moléculas de glucose galhoiladas, como é o caso do penta-, hexa-, hepta- e octagalhoil glucose, apresentam ter um limite máximo de relação entre o nível de galhoilação e a afinidade com as proteínas salivares, sendo que acima de cinco grupos galhoilo não se apresenta efeito adicional. Isto está de acordo com os resultados obtidos.

Em resumo, através desta análise verificou-se que os compostos que continham (-)-epicatequina e (+)-catequina (EGCG, ECG e B4) formam os que interagiram mais com as proteínas salivares. Os flavonóis apresentam menor interação, como se pode verificar nos compostos do extrato de brócolo (21) e de chá verde (K e Q), sendo que em ambos os extratos estes se comportam de forma parecida. Por fim, a presença de grupos galhoilo mostrou ter um papel mais importante na precipitação de proteínas salivares.

#### **4.7. Análise sensorial dos efeitos dos polissacarídeos numa infusão de chá verde**

Os dois testes triangulares realizados no âmbito de identificar se existe diferenças entre duas infusões de chá verde, com e sem polissacarídeos obtidos da casca da banana, obtiveram os resultados expressos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados obtidos no teste triangular de duas infusões de chá verde, com e sem polissacarídeos extraídos com água 16h e imidazole.

Respostas	Nº provadores	
	Água 16h	Imidazole 16h+2h
Certas	3	4
Erradas	2	1

Os dados obtidos no teste triangular foram analisados de acordo com a Tabela T8 de Meilgaard, Carr et al. (1999) (Figura 4A), que mostra que, para cinco provadores ( $n=5$ ) e nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) seriam necessárias 4 ou mais respostas corretas para concluir que os produtos são significativamente diferentes.

Para o primeiro teste triangular, em que foi apresentado infusão de chá verde e infusão de chá verde com polissacarídeos extraídos com água 16h, obteve-se três respostas corretas, menor que o número exigido pela tabela do Anexo 1, não se podendo concluir que as duas bebidas são diferentes.

Por outro lado, no segundo teste triangular realizado 30 min após o primeiro, na qual foi testada a diferença entre bebidas de chá verde com e sem polissacarídeo extraído com imidazole, verificou-se 4 respostas certas, podendo-se concluir, com um nível de significância de 5%, que os dois produtos são diferentes.

Para melhor entendimento destas diferenças seria necessário repetir a prova com um painel maior e com melhor controlo das condições de realização da prova (locais próprios, momento da realização da prova, entre outros).

#### 4.8. Importância dos compostos fenólicos na alimentação

Como já foi referido anteriormente, os compostos fenólicos têm um papel importante na alimentação devido às suas propriedades benéficas para a saúde humana (Rodríguez-Pérez, Segura-Carretero et al., 2019).

Tendo em conta os compostos fenólicos que mais interagiram com as proteínas salivares, e os dados reportados em literatura sobre as propriedades organoléticas destes, nomeadamente adstringência e amargor, foi desenhada uma tabela sumário de forma a tentar perceber como estes poderão influenciar a aceitação dos produtos de

onde foram extraídos. Na Tabela 10 encontram-se caracterizados ao nível de adstringência e amargor os compostos fenólicos que mais interagiram.

**Tabela 10.** Caracterizados dos compostos fenólicos mais precipitados de cada fração, ao nível de adstringência e amargor.

Extrato	Composto que mais interagiu	Adstringência	Amargor <sup>a</sup>
Ext. Brócolo	21	✓	✓
Ext. Chá verde	B2g	✓	✓
	EGCG	✓	✓
	ECG	✓	✓
Ext. Grainha	B4	✓	x
Ác. Tânico	Pentagalhoil glucose	✓	✓
	Hexagalhoil glucose	✓	x
	Heptagalhoil glucose	✓	x
	Octagalhoil glucose	✓	x

<sup>a</sup> Dados disponíveis em Dagan-Wiener, Di Pizio et al. (2018).

O brócolo é uma hortícola cujo consumo tem aumentado substancialmente na última década. Este aumento deve-se à elucidação sobre o seu alto teor em compostos fenólicos, vitaminas, minerais e fibras e baixo teor calórico (Nagraj, Chouksey, Jaiswal, & Jaiswal, 2020). Neste trabalho foi observado que o composto que mais interagiu com as proteínas salivares foi um derivado de kaempferol, que se encontra descrito como adstringente e amargo (Tabela 10) (Dagan-Wiener, Di Pizio et al., 2018; Virshette, Patil, & Somkuwar, 2019). Este e outros compostos fenólicos e glucosinolatos presentes no brócolo podem ser os responsáveis pela sensação de adstringência persentida nesta hortícola, o que é um impasse na aceitação deste produto pelo consumidor (Brückner, Schonhof, Kornelson, & Schrödter, 2005).

O chá verde, outro produto estudado, é a bebida não alcoólica mais consumida nos países asiáticos, sendo a Índia o seu maior consumidor, seguido da China. O consumo total de chá verde no mundo foi reportado como sendo 3 000 000 toneladas/ano (Kosugi, 2019). Este apresenta compostos descritos como adstringentes e amargos (Tabela 10) (Dagan-Wiener, Di Pizio et al., 2018; Zhuang, Dai et al., 2020). Estas duas sensações são as principais sentidas aquando da sua ingestão (Zhang, Yin et al., 2016). Para alguns consumidores estas são características apreciadas, mas para outros são consideradas como desagradáveis, sendo necessário a adição de açúcar e/ou leite para diminuição destas propriedades organoléticas (Ares, Barreiro, Deliza, & Gámbaro, 2009).

A uva é uma fruta amplamente produzida e consumida em todo o mundo. Os maiores produtores são os EUA, China, Itália e Europa (Gupta, Dey et al., 2020). Através de vários processos químicos é possível extrair compostos fenólicos normalmente da grainha de uvas tintas, um subproduto da indústria vitivinícola (Gupta, Dey et al., 2020). Este extrato pode ser utilizado na indústria alimentar como um protetor contra a acrilamida em batatas fritas, ou como antioxidante natural na indústria da carne (Unusan, 2020). Neste estudo, foi observado que a procianidina dimérica B4 foi a que apresentou maior interação com as proteínas salivares. Este dímero está descrito como sendo adstringente mas não amargo (de Freitas & Mateus, 2001). Estes compostos fenólicos podem ser extraídos naturalmente durante a produção de vinhos tintos dependendo do processo de vinificação utilizado, o que confere ao vinho a sensação de adstringência, característica apreciada nestes (Nascimento, Pinto et al., 2016).

Por fim, o ácido tânico é utilizado como aditivo na indústria alimentar, na clarificação de cerveja e vinhos, entre outros (Bulea, Khanb et al., 2020; Robles, 2014). Esta fração apresentou maior interação com saliva humana nos compostos com maior número de grupos galhoilo, que estão caracterizados como sendo adstringentes, mas apenas a PGG é considerada dar a sensação de amargor (J. R. Bacon & M. J. C. Rhodes, 2000; Dagan-Wiener, Di Pizio et al., 2018).

## 5. Conclusão

Para atingir o objetivo deste trabalho, foi estudada a interação de diferentes compostos fenólicos (extrato de brócolo, de chá verde e de grainha e ácido tânico), saliva humana e polissacarídeos obtidos por diferentes extrações da casca da banana, de forma a compreender como estes são capazes de precipitar as proteínas salivares, mecanismo descrito como sendo um dos principais contributos para a perceção da adstringência. Além disso, também permitiu perceber como os polissacarídeos extraídos da casca da banana impedem a precipitação das proteínas salivares pelos compostos fenólicos.

Os resultados deste estudo mostraram que os extratos de chá verde e o ácido tânico apresentam maior interação com as proteínas salivares, seguidos do extrato de grainha e por fim do extrato de brócolo. No extrato de chá verde, os compostos EGCG, ECG e B2g foram os mais interagiram com as proteínas salivares, principalmente a estaterina e o péptido P-B. No ácido tânico, os compostos com maior número de grupos galhoilo, penta-, hexa-, hepta e octagalhoil glucose foram os que mais precipitaram a estaterina e o péptido P-B. No extrato de grainha, ocorreu maior interação da procianidina dimérica B4, sendo a estaterina e o péptido P-B as famílias mais afetadas. No extrato de brócolo, um derivado de kaemperol foi o que apresentou maior afinidade para as proteínas, nomeadamente aPRPs. Por fim, também foi estudada a interação de infusão de chá verde com saliva humana, onde se verifica que, assim como acontece para o extrato, as proteínas mais afetadas são a estaterina e o péptido P-B.

Em relação ao efeito dos polissacarídeos, o estudo por SDS-PAGE mostrou que as frações extraídas com água 16h e imidazole são as que apresentam capacidade de recuperação de proteínas salivares, sendo esta última a mais eficiente. Devido ao curto tempo não foi possível estudar o perfil cromatográfico destas interações. A nível sensorial, os testes triangulares evidenciaram que a fração de imidazole apresentou uma diferença significativa. Para obtenção de dados mais precisos será necessário, numa perspetiva futura, a realização de uma nova prova sensorial com maior número de provadores.

Em resumo, o objetivo proposto do trabalho foi alcançado. A aplicação deste subproduto como modulador da adstringência abre portas para novos projetos de investigação e apresenta um potencial económico e ambiental para a indústria alimentar, tendo por mente uma economia circular.

## 6. Referências bibliográficas

- Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012, (2012).
- Adrar, N. S., Madani, K., & Adrar, S. (2019). Impact of the inhibition of proteins activities and the chemical aspect of polyphenols-proteins interactions. *PharmaNutrition*, 7, 100142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phanu.2019.100142>
- Afacan, B., Öztürk, V. Ö., Emingil, G., Köse, T., & Bostanci, N. (2018). Alarm anti-protease trappin-2 negatively correlates with proinflammatory cytokines in patients with periodontitis. *Journal of Periodontology*, 89(1), 58-66.
- Al-Manei, K., Almotairy, N., Bostanci, N., Kumar, A., & Grigoriadis, A. (2020). Effect of chewing on the expression of salivary protein composition: A systematic review. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 14(3), 1900039.
- Amano, O., Mizobe, K., Bando, Y., & Sakiyama, K. (2012). Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands—Overview of the japan salivary gland society-sponsored workshop—. *Acta histochemica et cytochemica*, 45(5), 241-250.
- Amerongen, A. N., & Veerman, E. (2002). Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral diseases*, 8(1), 12-22.
- Amoako, D., & Awika, J. M. (2016). Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Current Opinion in Food Science*, 8, 14-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.010>
- Aquino, C. F., Salomão, L. C. C., Ribeiro, S., Rocha, M., Siqueira, D. L. d., & Cecon, P. R. (2016). Carbohydrates, phenolic compounds and antioxidant activity in pulp and peel of 15 banana cultivars. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(4).
- Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., & Gámbaro, A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food research international*, 42(7), 871-878.
- Azarudeen, A. M., & Nithya, R. (2021). Pharmaceutical Aspects of Banana peel: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(2), 112-117.
- Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. (2000). Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 838-843.
- Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. C. (2000). Binding Affinity of Hydrolyzable Tannins to Parotid Saliva and to Proline-Rich Proteins Derived from It. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 838-843. doi:10.1021/jf990820z



- Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). Astringency: mechanisms and perception. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 858-875. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408390701724223?needAccess=true>
- Basheer, L., & Kerem, Z. (2015). Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566-5577.
- Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719.
- Bora, A. F. M., Ma, S., Li, X., & Liu, L. (2018). Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. *Food research international*, 105, 241-249.
- Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2018). Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontology 2000*, 76(1), 68-84.
- Bostanci, N., Selevsek, N., Wolski, W., Grossmann, J., Bao, K., Wahlander, A., . . . Afacan, B. (2018). Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(7), 1392-1409.
- Boulet, J.-C., Trarieux, C., Souquet, J.-M., Ducasse, M.-A., Caillé, S., Samson, A., . . . Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chemistry*, 190, 357-363.
- Brandão, E., Silva, M. S., Garcia-Estevez, I., Fernandes, A., Williams, P., Mateus, N., . . . Soares, S. (2017). Grape cell-wall polysaccharides: influence on the interaction between salivary proteins and tannins.
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., . . . Soares, S. (2019). Inhibition Mechanisms of Wine Polysaccharides on Salivary Protein Precipitation. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2014). In vivo interactions between procyanidins and human saliva proteins: effect of repeated exposures to procyanidins solution. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(39), 9562-9568.

- Brückner, B., Schonhof, I., Kornelson, C., & Schrödter, R. (2005). Multivariate Sensory Profile of Broccoli and Cauliflower and Consumer Preference. *Italian journal of food science*, 17(1).
- Bulea, M., Khanb, F., Nisard, M. F., & Niaze, K. (2020). Tannins (hydrolysable tannins, condensed tannins, phlorotannins, flavono-ellagitannins). *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 132-146.
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2009). Green tea: nature's defense against malignancies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(5), 463-473.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1989). Carbohydrate—polyphenol complexation. In *Chemistry and significance of condensed tannins* (pp. 307-322): Springer.
- Cai, Y., Zhang, J., Chen, N. G., Shi, Z., Qiu, J., He, C., & Chen, M. (2017). Recent advances in anticancer activities and drug delivery systems of tannins. *Medicinal research reviews*, 37(4), 665-701.
- Cala, O., Dufourc, E. J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., & Pianet, I. (2012). The colloidal state of tannins impacts the nature of their interaction with proteins: the case of salivary proline-rich protein/procyanidins binding. *Langmuir*, 28(50), 17410-17418.
- Canon, F., Paté, F., Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., Giuliani, A., Pérez, J., . . . Cabane, B. (2013). Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG. *Langmuir*, 29(6), 1926-1937.
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology*, 4, 267-276.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251-280.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(23), 8936-8944. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf061835h>
- Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M. T., & Messana, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in biotechnology*, 29(8), 409-418.
- Castagnola, M., Congiu, D., Denotti, G., Di Nunzio, A., Fadda, M. B., Melis, S., . . . Olianias, A. (2001). Determination of the human salivary peptides histatins 1, 3, 5 and statherin by high-performance liquid chromatography and by diode-array

- detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 751(1), 153-160.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1593-1601.
- Chen, Y.-L., Chang, M.-C., Chiang, Y.-C., Lin, H.-W., Sun, N.-Y., Chen, C.-A., . . . Cheng, W.-F. (2018). Immuno-modulators enhance antigen-specific immunity and anti-tumor effects of mesothelin-specific chimeric DNA vaccine through promoting DC maturation. *Cancer letters*, 425, 152-163.
- Chen, Y., & Hagerman, A. E. (2004). Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and  $\beta$ -1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 4008-4011.
- Chira, K., & Teissedre, P.-L. (2013). Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *European Food Research and Technology*, 236(4), 735-746.
- Dagan-Wiener, A., Di Pizio, A., Nissim, I., Bahia, M. S., Dubovski, N., Margulis, E., & Niv, M. Y. (2018). BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1179-D1185. doi:10.1093/nar/gky974
- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G., Vissink, A., . . . Narayana, N. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863-874.
- de Almeida, P. D. V., Gregio, A., Machado, M., De Lima, A., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 9(3), 72-80.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 940-945. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf000981z>
- de Moraes Arnoso, B. J., da Costa, G. F., & Schmidt, B. (2019). Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, 18(1), 39-48.
- de Paula, F., Teshima, T. H. N., Hsieh, R., Souza, M. M., Nico, M. M. S., & Lourenco, S. V. (2017). Overview of human salivary glands: highlights of morphology and developing processes. *The Anatomical Record*, 300(7), 1180-1188.

- Delimont, N. M., Rosenkranz, S. K., Haub, M. D., & Lindshield, B. L. (2017). Salivary proline-rich protein may reduce tannin-iron chelation: a systematic narrative review. *Nutrition & metabolism*, 14(1), 47.
- Dias, R., Perez-Gregorio, R., Mateus, N., & De Freitas, V. (2015). The interaction between tannins and gliadin derived peptides in a celiac disease perspective. *Rsc Advances*, 5(41), 32151-32158.
- Dinnella, C., Recchia, A., Tuorila, H., & Monteleone, E. (2011). Individual astringency responsiveness affects the acceptance of phenol-rich foods. *Appetite*, 56(3), 633-642.
- Doco, T., Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., . . . Soares, S. (2018). Are polysaccharides important to modulate protein/tannin interactions?
- Duffy, V. B. (2007). Variation in oral sensation: implications for diet and health. *Current opinion in gastroenterology*, 23(2), 171-177.
- El-Magd, A., Mahmoud, A. R., Hafiz, M. M., & Ali, A. H. (2013). Effect of different levels of mineral phosphorus fertilizer and bio-phosphorus on vegetative growth, head yield and quality of broccoli. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 9(5), 164-169.
- Engelen, L., van den Keybus, P. A., de Wijk, R. A., Veerman, E. C., Amerongen, A. V. N., Bosman, F., . . . van der Bilt, A. (2007). The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Archives of Oral Biology*, 52(6), 518-525.
- Esatbeyoglu, T., Wray, V., & Winterhalter, P. (2010). Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, and B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(13), 7820-7830. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf101023e>
- FAO. (2019). FAOSTAT: Banana production quantity by countries. In.
- Fontana, A., de Laureto, P. P., Spolaore, B., & Frare, E. (2012). Identifying disordered regions in proteins by limited proteolysis. In *Intrinsically disordered protein analysis* (pp. 297-318): Springer.
- Forino, M., Picariello, L., Rinaldi, A., Moio, L., & Gambuti, A. (2020). How must pH affects the level of red wine phenols. *LWT*, 129, 109546. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109546>

- Gao, X., Ge, S., Cai, Q., Zeng, K., & Grimes, C. A. (2008). Kinetic study on the interaction between tannin and bovine serum albumin with a wireless magnetoelastic biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129(2), 929-933.
- Gibbins, H., & Carpenter, G. (2013). Alternative mechanisms of astringency—what is the role of saliva? *Journal of Texture Studies*, 44(5), 364-375.
- Gibbins, H. L., Yakubov, G. E., Proctor, G. B., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 184-192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.020>
- Gibis, M., Thellmann, K., Thongkaew, C., & Weiss, J. (2014). Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. *Food hydrocolloids*, 41, 119-131.
- González-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350. doi:[https://doi.org/10.1016/0091-7435\(92\)90041-F](https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90041-F)
- Grassl, N., Kulak, N. A., Pichler, G., Geyer, P. E., Jung, J., Schubert, S., . . . Mann, M. (2016). Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome medicine*, 8(1), 1-13.
- Green, B. G. (1993). Oral astringency: a tactile component of flavor. *Acta psychologica*, 84(1), 119-125.
- Guerreiro, C., Brandão, E., de Jesus, M., Gonçalves, L., Pérez-Gregório, R., Mateus, N., . . . Soares, S. (2021). New insights into the oral interactions of different families of phenolic compounds: Deepening the astringency mouthfeels. *Food Chemistry*, 131642.
- Gupta, M., Dey, S., Marbaniang, D., Pal, P., Ray, S., & Mazumder, B. (2020). Grape seed extract: Having a potential health benefits. *Journal of food science and technology*, 57(4), 1205-1215.
- Happi Emaga, T., Robert, C., Ronkart, S. N., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresource Technology*, 99(10), 4346-4354. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.030>

- Harvey, N. M., Carpenter, G. H., Proctor, G. B., & Klein, J. (2011). Normal and frictional interactions of purified human statherin adsorbed on molecularly-smooth solid substrata. *Biofouling*, 27(8), 823-835.
- Hayat, K., Iqbal, H., Malik, U., Bilal, U., & Mushtaq, S. (2015). Tea and its consumption: benefits and risks. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(7), 939-954.
- Helmerhorst, E. J., Traboulsi, G., Salih, E., & Oppenheim, F. G. (2010). Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. *Journal of proteome research*, 9(10), 5413-5421.
- Hofmann, T., Glabasnia, A., Schwarz, B., Wisman, K. N., Gangwer, K. A., & Hagerman, A. E. (2006). Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9503-9509.
- Holmberg, K. V., & Hoffman, M. P. (2014). Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. In *Saliva: Secretion and Functions* (Vol. 24, pp. 1-13): Karger Publishers.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*, 85(2), 162-169.
- Hwang, Y. P., Oh, K. N., Yun, H. J., & Jeong, H. G. (2011). The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Journal of dermatological science*, 61(1), 23-31.
- Inzitari, R., Cabras, T., Rossetti, D. V., Fanali, C., Vitali, A., Pellegrini, M., . . . Messina, I. (2006). Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics*, 6(23), 6370-6379.
- Jaeger, S. R., Axten, L. G., Wohlers, M. W., & Sun-Waterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages: insights from sensory and consumer science. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2356-2363.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and environmental microbiology*, 80(10), 2991-2997.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions.

- Biomacromolecules*, 5(3), 942-949. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bm0345110>
- Kang, H. W., Lee, S. G., Otieno, D., & Ha, K. (2018). Flavonoids, potential bioactive compounds, and non-shivering thermogenesis. *Nutrients*, 10(9), 1168.
- Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., . . . Cho, S.-G. (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 569.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim, B.-H., Choi, M. S., Lee, H. G., Lee, S.-H., Noh, K. H., Kwon, S., . . . Park, J. Y. (2015). Photoprotective potential of penta-O-galloyl- $\beta$ -Dglucose by targeting NF- $\kappa$ B and MAPK signaling in UVB radiation-induced human dermal fibroblasts and mouse skin. *molecules and Cells*, 38(11), 982.
- Klepacka, J., Gujska, E., & Michalak, J. (2011). Phenolic compounds as cultivar-and variety-distinguishing factors in some plant products. *Plant foods for human nutrition*, 66(1), 64-69.
- Kordiš, D., & Turk, V. (2009). Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1-22.
- Kosugi, Y. (2019). Green tea consumption. *World Green Tea Association Available at: <https://www.o-cha.net/english/teacha/distribution/greentea3.html> (accessed January 10, 2020).*
- Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela-Silva, F., Lopes, O., Tavares, S., & Gaspar, R. (2016). Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects.
- Landete, J. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food research international*, 44(5), 1150-1160.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271): Elsevier.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1725(1), 10-18.

- Levine, M. J. (1993). Development of artificial salivas. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(3), 279-286.
- Li, A.-N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- Li, L., Shaik, A. A., Zhang, J., Nhkata, K., Wang, L., Zhang, Y., . . . Lü, J. (2011). Preparation of penta-O-galloyl- $\beta$ -d-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(3), 545-550. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.028>
- Li, Z., Lee, H. W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D., & Ong, C. N. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules*, 23(5), 1139.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., . . . Liu, Y. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.
- Liu, Y., Luo, L., Liao, C., Chen, L., Wang, J., & Zeng, L. (2018). Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: A study using response surface methodology. *Food Chemistry*, 269, 24-34.
- Lucci, P., Saurina, J., & Núñez, O. (2017). Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 88, 1-24.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., & de Freitas, V. (2004). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 135-140.
- McRae, J. M., Ziora, Z. M., Kassara, S., Cooper, M. A., & Smith, P. A. (2015). Ethanol concentration influences the mechanisms of wine tannin interactions with poly (L-proline) in model wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(17), 4345-4352.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (1999). *Sensory evaluation techniques*: CRC press.
- Messana, I., Cabras, T., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, C., . . . Castagnola, M. (2004). Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *Journal of proteome research*, 3(4), 792-800.



- Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C., & Bertuccioli, M. (2004). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, *15*(7-8), 761-769.
- Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., & García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(5), 1508-1522.
- Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1994). Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *European journal of biochemistry*, *219*(3), 923-935.
- Nadathur, S., & Carolan, M. (2017). Flavors, taste preferences, and the consumer: Taste modulation and influencing change in dietary patterns for a sustainable earth. In *Sustainable protein sources* (pp. 377-389): Elsevier.
- Nagraj, G. S., Chouksey, A., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2020). Chapter 1 - Broccoli. In A. K. Jaiswal (Ed.), *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 5-17): Academic Press.
- Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(1), 331-339.
- Namal Senanayake, S. P. J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1529-1541. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>
- Nascimento, A. P. S., Pinto, A. L., Duarte, M. E. M., de Sousa, F. C., & dos Santos Araújo, A. (2016). Influência da concentração de proteína, da força iónica e o tipo de hidrato de carbono na formação de complexos tanino-proteína. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, *11*(1), 23.
- Newsome, A. G., Li, Y., & van Breemen, R. B. (2016). Improved quantification of free and ester-bound gallic acid in foods and beverages by UHPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(6), 1326-1334.
- Niemetz, R., & Gross, G. G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, *66*(17), 2001-2011.
- Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2008). Effect of candying on cell wall polysaccharides of plums (*Prunus domestica* L.) and influence of cell wall enzymes. *Food Chemistry*, *111*(3), 538-548.
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., . . . Azeredo, H. M. C. (2016). Optimization of pectin extraction from banana

- peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*, 198, 113-118. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food research international*, 74, 10-36.
- Pires, M. A., Pastrana, L. M., Fuciños, P., Abreu, C. S., & Oliveira, S. M. (2020). Sensorial Perception of Astringency: Oral Mechanisms and Current Analysis Methods. *Foods*, 9(8), 1124.
- Plet, B., Delcambre, A., Chaignepain, S., & Schmitter, J.-M. (2015). Affinity ranking of peptide–polyphenol non-covalent assemblies by mass spectrometry approaches. *Tetrahedron*, 71(20), 3007-3011.
- Qamar, Z., Rahim, Z. B. H. A., Chew, H. P., & Fatima, T. (2016). Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid a Substitute of Salivary Protein Statherin? *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 38(4).
- Ramos-Pineda, A., Carpenter, G., García-Estévez, I., & Escibano-Bailón, M. (2019). Influence of Chemical Species on Polyphenol–Protein Interactions Related to Wine Astringency. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Dueñas, M., & Escibano-Bailón, M. T. (2018). Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins. *Food Chemistry*, 264, 226-232.
- Rinaldi, A., & Moio, L. (2020). Salivary Protein-Tannin Interaction: The Binding behind Astringency. In *Winemaking-Stabilization, Aging Chemistry and Biochemistry*: IntechOpen.
- Roblegg, E., Coughran, A., & Sirjani, D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142, 133-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>
- Robles, H. (2014). Tannic Acid. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 474-475). Oxford: Academic Press.
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(8), 1212-1229. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408398.2017.1399859?needAccess=true>
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, 22(1), 19-34.

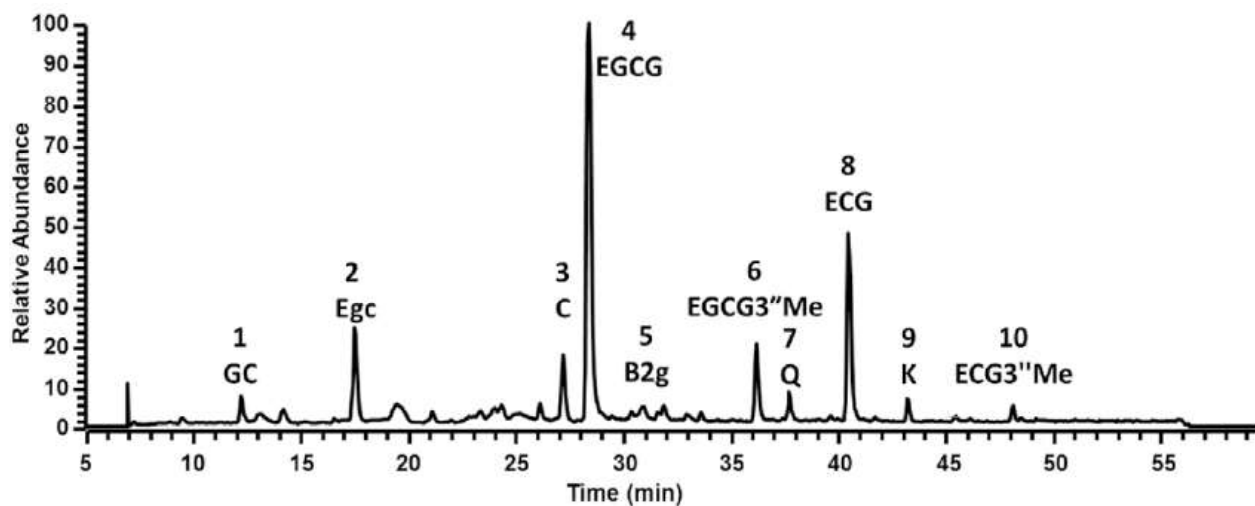
- Sanlier, N., Gokcen, B. B., & Altuğ, M. (2018). Tea consumption and disease correlations. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 95-106.
- Saric, S., Notay, M., & Sivamani, R. K. (2017). Green tea and other tea polyphenols: Effects on sebum production and acne vulgaris. *Antioxidants*, 6(1), 2.
- Sekowski, S., Ionov, M., Kaszuba, M., Mavlyanov, S., Bryszewska, M., & Zamaraeva, M. (2014). Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 623-628.
- Silva, M. S., García-Estévez, I., Brandão, E., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2017). Molecular interaction between salivary proteins and food tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6415-6424. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.7b01722>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1244-1262.
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2019). Development of a New Cell-Based Oral Model To Study the Interaction of Oral Constituents with Food Polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(46), 12833-12843. doi:10.1021/acs.jafc.9b05575
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *Molecules*, 25(11), 2590.
- Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: Astringency and bitterness. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(5), 937-948. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408398.2014.946468?needAccess=true>
- Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2012a). Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(15), 3966-3972.
- Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2012b). Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food research international*, 49(2), 807-813.
- Soares, S., Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Oral interactions between a green tea flavanol extract and red wine anthocyanin

- extract using a new cell-based model: insights on the effect of different oral epithelia. *Scientific reports*, *10*(1), 1-16.
- Soares, S., Vitorino, R., Osorio, H., Fernandes, A., Venancio, A., Mateus, N., . . . de Freitas, V. (2011). Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(10), 5535-5547.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G., & Luo, Y. (2009). Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(7), 1289-1295.
- Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D., Campina, F. F., Silva, R. L., Costa, M. d. S., Menezes, I. R., . . . Leal-Balbino, T. C. (2016). Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, *97*, 9-13.
- Torres-León, C., Ventura-Sobrevilla, J., Serna-Cock, L., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J., & Aguilar, C. N. (2017). Pentagalloylglucose (PGG): a valuable phenolic compound with functional properties. *Journal of Functional Foods*, *37*, 176-189.
- Unusan, N. (2020). Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods*, *67*, 103861. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>
- Vasanthi, H. R., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2009). Potential health benefits of broccoli—a chemico-biological overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *9*(6), 749-759.
- Virshette, S., Patil, M., & Somkuwar, A. (2019). A review on medicinal plants used as anti inflammatory agents. *J. Pharmacogn. Phytochem*, *8*, 1641-1646.
- Vu, H. T., Scarlett, C. J., & Vuong, Q. V. (2018). Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods*, *40*, 238-248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>
- Wei, C., Yang, H., Wang, S., Zhao, J., Liu, C., Gao, L., . . . She, G. (2018). Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(18), E4151-E4158.
- Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., & Mine, Y. (2019). Recent advances in the understanding of the health benefits and molecular mechanisms associated with green tea polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, *67*(4), 1029-1043.

- Yang, C. S., Chen, G., & Wu, Q. (2014). Recent scientific studies of a traditional Chinese medicine, tea, on prevention of chronic diseases. *Journal of traditional and complementary medicine*, 4(1), 17-23.
- Yang, J.-E., & Lee, J. (2020). Consumer perception and liking, and sensory characteristics of blended teas. *Food science and biotechnology*, 29(1), 63-74.
- Yu, P., Yeo, A. S.-L., Low, M.-Y., & Zhou, W. (2014). Identifying key non-volatile compounds in ready-to-drink green tea and their impact on taste profile. *Food Chemistry*, 155, 9-16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.046>
- Zhang, Y.-N., Yin, J.-F., Chen, J.-X., Wang, F., Du, Q.-Z., Jiang, Y.-W., & Xu, Y.-Q. (2016). Improving the sweet aftertaste of green tea infusion with tannase. *Food Chemistry*, 192, 470-476. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.046>
- Zhuang, J., Dai, X., Zhu, M., Zhang, S., Dai, Q., Jiang, X., . . . Xia, T. (2020). Evaluation of astringent taste of green tea through mass spectrometry-based targeted metabolic profiling of polyphenols. *Food Chemistry*, 305, 125507.

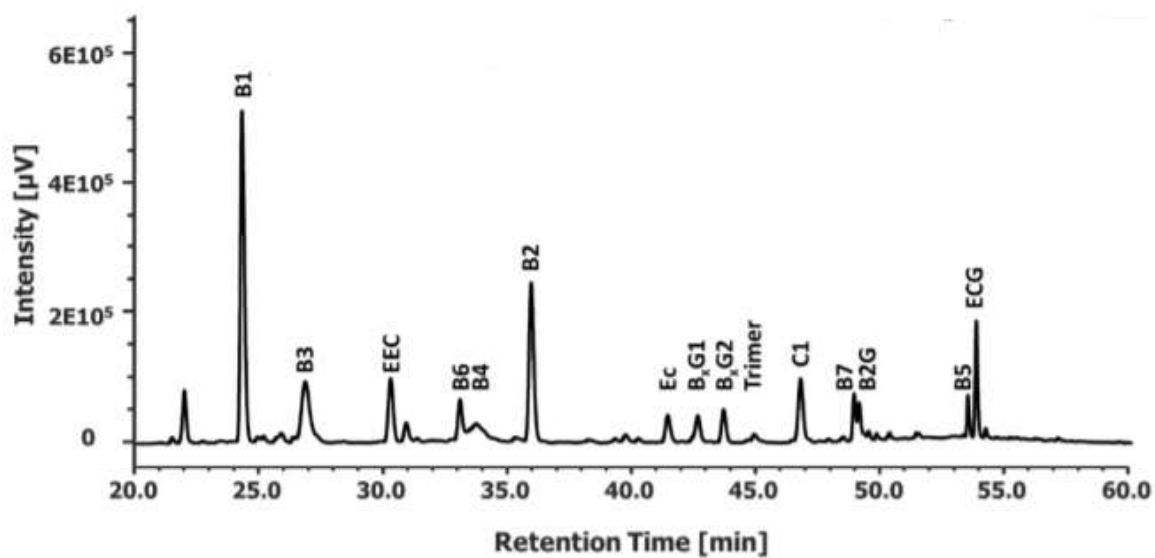
# Anexos

## Anexo 1



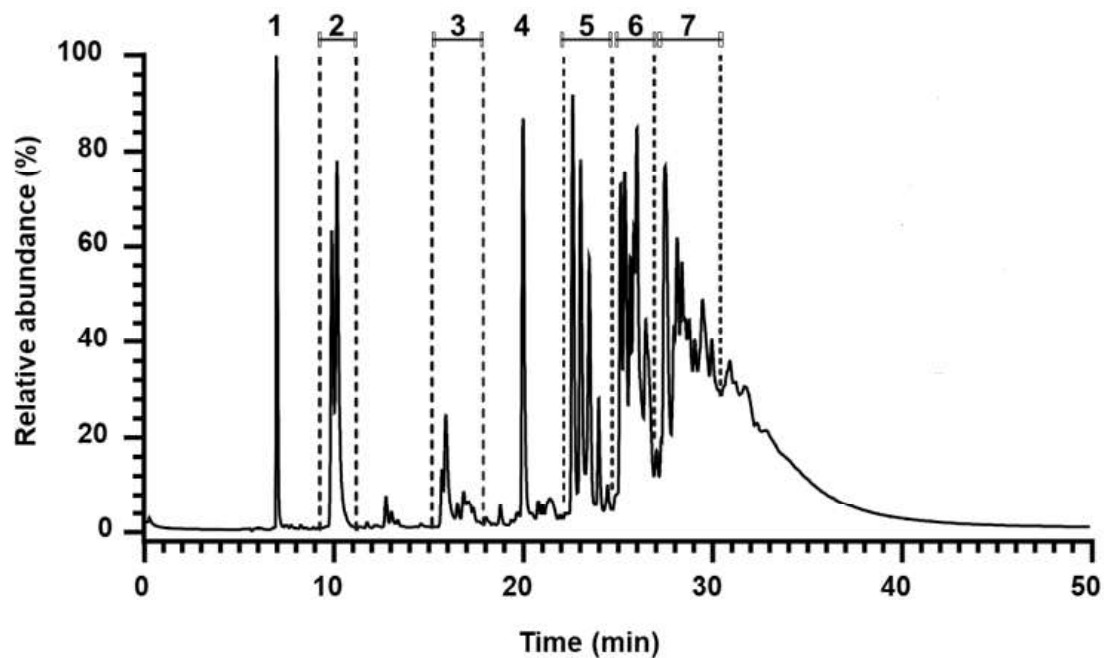
**Figura 1A.** Espectro de massa de LC-MS do extrato de chá verde. Adaptado de Soares, Soares et al. (2020). GC – galhocatequina; EGC – epigalhocatequina; C – catequina; EGCG – epigalhocatequina galhato; B2g – dímero de procianidinas; EGCG3''Me – epigalhocatequina-3-O-galhato; Q – quercetina; ECG – epicatequina galhato; K – kaempferol e ECG3''Me – epicatequina-3-O-galhato.

## Anexo 2



**Figura 2A.** Cromatograma de HPLC detetado a 280 nm do extrato de grainha. Adaptado de Soares, Brandão et al. (2019). B1 a B7 – dímeros de procianidina; EEC – trímero de procianidina de epicatequina-epicatequina-catequina; EC – epicatequina; C1 – trímero de procianidina C1; ECG – epicatequina galhato; B<sub>x</sub>G1 e B<sub>x</sub>G2 – dímeros galhoilados de procianidina.

## Anexo 3



**Figura 3A.** Espectro de massa de LC-MS do ácido tânico. Adaptado de Guerreiro, Brandão et al. (2021). 1- ácido gálgico; 2 - ácido di-gálgico; 3 - ácido tri-gálgico; 4 - pentagalhoil glucose; 5 - hexagalhoil glucose; 6 - heptagalhoil glucose; 7 - octagalhoil glucose.



## Anexo 4

**TABLE T8**  
**Critical Number of Correct Responses in a Triangle Test**  
**(Entries are  $x_{\alpha,n}$ )**

Entries are the minimum number of correct responses required for significance at the stated  $\alpha$ -level (i.e., column) for the corresponding number of respondents,  $n$  (i.e., row). Reject the assumption of "no difference" if the number of correct responses is greater than or equal to the tabled value.

$n$	$\alpha$							$n$	$\alpha$						
	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001		0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
3	2	2	3	3	3	—	—	31	12	13	14	15	16	18	20
4	3	3	3	4	4	—	—	32	12	13	14	15	16	18	20
5	3	3	4	4	4	5	—	33	13	13	14	15	17	18	21
6	3	4	4	5	5	6	—	34	13	14	15	16	17	19	21
7	4	4	4	5	5	6	7	35	13	14	15	16	17	19	22
8	4	4	5	5	6	7	8	36	14	14	15	17	18	20	22
9	4	5	5	6	6	7	8	42	16	17	18	19	20	22	25
10	5	5	6	6	7	8	9	48	18	19	20	21	22	25	27
11	5	5	6	7	7	8	10	54	20	21	22	23	25	27	30
12	5	6	6	7	8	9	10	60	22	23	24	26	27	30	33
13	6	6	7	8	8	9	11	66	24	25	26	28	29	32	35
14	6	7	7	8	9	10	11	72	26	27	28	30	32	34	38
15	6	7	8	8	9	10	12	78	28	29	30	32	34	37	40
16	7	7	8	9	9	11	12	84	30	31	33	35	36	39	43
17	7	8	8	9	10	11	13	90	32	33	35	37	38	42	45
18	7	8	9	10	10	12	13	96	34	35	37	39	41	44	48
19	8	8	9	10	11	12	14	102	36	37	39	41	43	46	50
20	8	9	9	10	11	13	14	108	38	40	41	43	45	49	53
21	8	9	10	11	12	13	15	114	40	42	43	45	47	51	55
22	9	9	10	11	12	14	15	120	42	44	45	48	50	53	57
23	9	10	11	12	12	14	16	126	44	46	47	50	52	56	60
24	10	10	11	12	13	15	16	132	46	48	50	52	54	58	62
25	10	11	11	12	13	15	17	138	48	50	52	54	56	60	64
26	10	11	12	13	14	15	17	144	50	52	54	56	58	62	67
27	11	11	12	13	14	16	18	150	52	54	56	58	61	65	69
28	11	12	12	14	15	16	18	156	54	56	58	61	63	67	72
29	11	12	13	14	15	17	19	162	56	58	60	63	65	69	74
30	12	12	13	14	15	17	19	168	58	60	62	65	67	71	76
								174	61	62	64	67	69	74	79
								180	63	64	66	69	71	76	81

Note: For values of  $n$  not in the table, compute  $z = (k - 1(1/3)n) / \sqrt{(2/9)n}$ , where  $k$  is the number of correct responses. Compare the value of  $z$  to the  $\alpha$ -critical value of a standard normal variable, i.e., the values in the last row of Table T3 ( $z_{\alpha} = t_{n,\infty}$ ).

**Figura 4A.** Tabela de números críticos de respostas corretas num teste triangular. Adaptado de Meilgaard, Carre t al. (1999).