



2013

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Variabilidade Genética Associada à Percepção Sensorial dos Vinhos

Laura Nascimento Almeida

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Variabilidade Genética Associada à Perceção Sensorial dos Vinhos

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Catarina Gomes (Biocant) e do Professor Doutor Jorge Canhoto (Universidade de Coimbra)

Laura Nascimento Almeida

2013

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste ano de dissertação pude contar com o enorme apoio, a boa disposição e grande força de numerosas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que esta chegasse ao fim.

Em primeiro lugar, queria agradecer e expressar o meu profundo reconhecimento à minha orientadora Doutora Ana Catarina Gomes pela oportunidade de me integrar na sua equipa de laboratório na unidade de genómica do Biocant no sentido de realizar a minha dissertação, mas também pelo seu acompanhamento e ensinamentos científicos.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, pela sua orientação, conselhos e sabedoria passando pela sua simpatia e disponibilidade sempre manifestadas.

Aos trabalhadores e investigadores do Biocant pelo acolhimento, união e simpatia. Em particular aos meus colegas de laboratório por todo o apoio, ajuda, amizade, boa disposição e conselhos que me ofereceram para o bom desenrolar deste trabalho: à Susana, à Valéria, ao Daniel, à Raquel, à Joana, à Cátia, à Marisa, ao André e ao Rodrigo.

A todas as pessoas que se voluntariaram tornando possível a realização deste estudo.

Um profundo agradecimento à pessoa que mais me apoiou e incentivou nesta etapa da minha vida, Pedro. Mas também por todo o carinho, amor e amizade que levaram à minha estabilidade emocional, imprescindível nesta fase.

Aos meus amigos por toda a amizade, partilha, apoio e incentivo, sempre no sentido de me fazer crescer, acreditar e sorrir. Um obrigado especial aos amigos da faculdade e de Coimbra: à Melissa, à Mariana, à Joana, à Ana, à Catarina, à Tânia, ao Tiago, ao Rui e ao Ricardo; E também aos meus amigos da terrinha que estão sempre presentes: à Gwen, à Mariana e à Sónia.

Por último e sobretudo, desejo expressar a minha mais profunda e sincera gratidão à minha família por serem as pessoas mais importantes para mim. Aos meus pais, por toda a ajuda, amor e dedicação incondicional que me têm prestado ao longo da minha vida. E aos meus irmãos David e Fabien pelos diversos momentos, apoio e vivências inesquecíveis com reflexo direto na minha vida.

A todos, um sincero obrigado.

Resumo

Os compostos fenólicos do vinho, responsáveis pela cor, corpo e adstringência, interagem com as proteínas salivares. Os taninos incluem-se no grupo dos compostos fenólicos flavonóides e são os responsáveis por essa interação provocando a sensação de adstringência. Este fenómeno é caracterizado pela perda da lubrificação da saliva provocada pela ocorrência de precipitação das proteínas ricas em prolina (PRPs) na cavidade oral.

Embora exista uma variedade de proteínas que interagem com os taninos do vinho, as PRPs apresentam uma interação mais significativa assumindo um papel importante na sensação de adstringência. Deste modo, e tendo em conta a elevada variabilidade genética observada nos genes codificantes das PRP, o objetivo deste projeto foi implementar um protocolo para o estudo da variabilidade genética das PRPs associada à percepção sensorial dos vinhos.

Os genes PRPs são altamente variáveis sendo o tipo mais comum destas variações os *SNPs* (*single-nucleotide polymorphisms*). Este tipo de polimorfismo consiste na alteração da sequência de DNA que ocorre quando um único nucleótido (adenina, timina, citosina ou guanina) difere entre indivíduos de uma espécie ou entre cromossomas homólogos de um indivíduo. Assim, através da identificação de SNPs é possível avaliar esta variabilidade. Como tal, depois de uma profunda análise bioinformática, selecionaram-se as regiões com maior variabilidade, e estudaram-se os SNPs presentes numa amostra total de 18 indivíduos, através da amplificação e sequenciação de fragmentos codificantes dos genes PRPs. Implementou-se assim o protocolo e obteve-se a prova de conceito para um estudo mais aprofundado da variabilidade genética destas regiões na população portuguesa.

Palavras-chave: Adstringência, diversidade genética, genes PRP, PRPs, taninos, SNPs.

Abstract

Wine phenolics, responsible for the body, color and astringency, interact with the salivary proteins. Tannins belong to the group of the flavonoid phenolics compounds and are responsible for that interaction leading to the sensation of astringency. This phenomenon is characterized by the loss of the lubrication of the saliva induced by the precipitation of the proline rich proteins (PRPs) in the oral cavity.

Although there are a wide variety of proteins that interact with wine tannins, PRPs have shown more significant interaction assuming an important role in the sensation of astringency. Therefore, knowing the high genetic variability observed in the genes that encode the PRPs, the aim of this project was to implement a protocol in order to study the genetic variability of the PRPs associated with the sensorial perception of the wine.

PRPs genes are highly variable, being the SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) the most common type. This kind of polymorphism consists in the alteration of the DNA sequence that occurs when one single nucleotide (adenine, thymine, cytosine or guanine) differs among individuals of the same specie or differs among the chromosomes of the same individual. Thus, through the identification of the SNPs it is possible to evaluate this variability. As such, after a deep computer analysis, the regions with higher variability were selected and the SNPs present were studied in a total of 18 individuals, through the amplification and sequencing of the fragments of genes encoding PRPs. The protocol was implemented and we obtained the proof of concept for a deeper study about the genetic variability of these regions in the Portuguese population.

Keywords: Astringency, genetic diversity, PRP genes, PRPs, tannins, SNPs.

1. ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. COMPOSTOS FENÓLICOS na alimentação: Importância	3
1.1.1. Características funcionais.....	4
1.1.2. Características sensoriais	4
1.1.3. Efeito dos compostos fenólicos: na digestão e na saúde.....	5
1.2. Compostos fenólicos no vinho	7
1.2.1. Características funcionais, sensoriais e estruturais	7
1.2.2. Compostos fenólicos não flavonóides – características	8
1.2.3. Compostos fenólicos flavonóides – características.....	10
1.3. TANINOS	12
1.3.1. Taninos Hidrolizáveis	13
1.3.2. Taninos Condensados	13
1.4. INTERACÇÃO ENTRE PROTEÍNAS E TANINOS: Tipo de interacção e modelos de agregação proteína-tanino	14
1.4.1. Adstringência	16
1.4.1.1. Proteínas salivares	19
1.4.1.2. Proteínas ricas em prolina (PRPs)	22
1.4.1.3. Interacção taninos e PRPs	23
1.4.1.4. PRPs como 1ª linha de defesa contra taninos dietéticos ..	25
1.4.1.5. Factores que influenciam a adstringência	26
1.5. GENES PRPs	28
1.5.1. Estrutura e características dos genes PRP	28
1.5.2. Genes <i>PRH1</i> e <i>PRH2</i>	29

1.5.3.	Genes <i>PRB1</i> , <i>PRB2</i> , <i>PRB3</i> e <i>PRB4</i>	31
1.5.4.	Variabilidade genética.....	33
2.	OBJETIVOS	37
3.	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1.	<i>In silico</i> – Análise bioinformática.....	43
3.1.1.	Pesquisa das sequências genéticas e dos SNPs associados aos genes PRPs.....	43
3.2.	Colheita da amostra.....	43
3.2.1.	Extração de DNA.....	43
3.2.2.	Quantificação do DNA.....	44
3.3.	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	44
3.3.1.	Primers.....	44
3.3.2.	Amplificação dos exões.....	45
3.4.	Deteção dos produtos de PCR – Eletroforese.....	46
3.5.	Purificação dos produtos de PCR.....	46
3.6.	Genotipagem de SNPs – Método de Sanger.....	47
3.6.1.	Reação de sequenciação.....	47
3.6.2.	Purificação dos produtos da reacção de sequenciação e electroforese capilar.....	47
3.7.	Análise de dados.....	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1.	Identificação e caracterização de genes PRPs.....	51
4.1.1.	Pesquisa e caracterização de SNPs descritos.....	53
4.2.	Desenho dos <i>primers</i>	55
4.3.	Amplificação dos exões.....	56
4.3.1.	Amplificação do exão 1 do gene <i>PRH2</i>	56
4.3.2.	Amplificação do exão 3 do gene <i>PRH2</i>	57

4.3.3.	Amplificação do exão 4 do gene <i>PRB3</i>	58
4.3.4.	Amplificação do exão 3 do gene <i>PRB4</i>	59
4.4.	Genotipagem dos genes codificantes das PRPs	61
5.	CONCLUSÕES	69
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Anexo

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Via metabólica de produção de fenilpropanóides (Shahidi e Naczki, 2004).....	4
Figura 2 – Estrutura representativa de vários polifenóis (A – Ácido gálico; B – Estrutura básica dos flavonóides; C – Flavona; D – Flavonol; E – Flavan-3-ol (flavonóides); F - Epigalocatequina galhato) (Bennick, 2002)	8
Figura 3 – Estrutura e nomenclatura dos principais ácidos benzoicos (a) ácidos cinâmicos (b) e estrutura do transresveratrol (c) de <i>Vitis vinifera</i> (Viccari <i>et al.</i> , 2009).....	9
Figura 4 – Estrutura representativa dos taninos (A – Pentagalolilglucose; B – Estrutura básica dos taninos condensados) (Bennick, 2002).....	13
Figura 5 – Representação esquemática geral das etapas de interação e precipitação entre os polifenóis e as proteínas (Monteleone <i>et al.</i> , 2004).....	14
Figura 6 – Modelo representativo de possíveis interações proteínas-polifenóis (Asano <i>et al.</i> , 1982)	16
Figura 7 – Roda das sensações orais (Gawel, 2000; Pickering e Bajec, 2008) ...	19
Figura 8 – Esquema representativo da localização das glândulas maioritárias (Carvalho, 2007)	20

Figura 9 – Percentagem de redução da concentração de proteína livre para cada família de proteínas salivares (interação com taninos condensados extraídos (GSF)) (Soares <i>et al.</i> , 2011).....	21
Figura 10 – Modela em 3 fases da ligação PRPs com os polifenóis (Jöbstl <i>et al.</i> , 2004).....	23
Figura 11 – Sequência de aminoácidos da glicoproteína rica em prolina GP66sm codificada pelo gene MP2 de PRP de rato (Carlson, 1993)	29
Figura 12 – Mapa de restrição dos genes <i>PRH1</i> e <i>PRH2</i> (Kim e Maeda, 1985).30	
Figura 13 – Comparação das sequências dos genes <i>PRH1</i> e <i>PRH2</i> (Kim e Maeda, 1985)	31
Figura 14 – Mapas de restrição das regiões dos genes <i>PRB1</i> , <i>PRB2</i> , <i>PRB3</i> e <i>PRB4</i> . Locais enzimáticos: <i>Bam</i> HI (B), <i>Bgl</i> III (Bg), <i>Eco</i> RI (E), e <i>Hind</i> III (H). As barras a tracejado ilustram a região da sequência de cada gene (Kim <i>et al.</i> , 1993).....	32
Figura 15 – Mapa de variação do gene <i>PRB2</i> (Proteína rica em Prolina da subfamília <i>Bst</i> NI 2) (www.ensembl.org).....	33
Figura 16 – Mapa de SNPs do gene <i>PRH2</i> . Nesta figura está representado o conteúdo e tipo de SNPs de ambos os transcritos do gene <i>PRH2</i> apenas em zonas de exões	54
Figura 17 – Teste de amplificação aos <i>primers PRH2E1</i> em gel de agarose 1%. A – Teste de amplificação nas amostras Ind_3 e Ind_4. B – Teste de amplificação nas amostras Ind_5-20. Ao lado de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).....	57
Figura 18 – Teste de amplificação aos <i>primers PRH2E3</i> em gel de agarose 1%. A – Teste de amplificação nas amostras Ind_3 e Ind_4. B – Teste de amplificação nas amostras Ind_5-10. C – Teste de amplificação nas amostras Ind_11- 20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).....	58
Figura 19 – Teste de amplificação aos <i>primers PRB3E4</i> em gel de agarose 1%. A – Teste de amplificação nas amostras Ind_3-10. B – Repetição do teste de	

amplificação das amostras Ind_7 e Ind_8. C – Teste de amplificação nas amostras Ind_11-20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).....	59
Figura 20 – Teste de amplificação aos <i>primers PRB4E3</i> em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizaram-se 8 amostras (Ind_3-10)	60
Figura 21 – Otimização dos pares de <i>primers PRB4E3</i> a diferentes temperaturas de <i>annealing</i> (Ta) - 51°C, 52°C e 53°C. Na extremidade encontra-se o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se o controlo positivo	60
Figura 22 – Teste de amplificação aos <i>primers PRB4E3</i> em gel de agarose 1%. A – Teste de amplificação nas amostras Ind_3-10. B –Teste de amplificação nas amostras Ind_11-20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).....	61
Figura 23 – Exemplo de um electroferograma obtido por genotipagem do SNP rs116998526 (caracterizado na tabela X) de três indivíduos diferentes: Ind_13, Ind_15 e Ind_10. Ind_13 é homozigótico para o alelo G, o Ind_10 é homozigótico para o alelo A e o Ind_15 C é heterozigótico.....	63
Figura 24 – Sequências alinhadas para a região do exão 3 do gene <i>PRH2</i> . A primeira sequência corresponde à sequência contendo todos os SNPs descritos nesta região. Os pontos (.) correspondem a zonas conservadas. Na posição 464 encontra-se o SNP rs10772391 (ver tabela 8)	64
Figura 25 – Representação gráfica da frequência (em percentagem) dos diferentes tipos de SNPs encontrados nas amostras	66

3. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de alguns alimentos com teor em compostos fenólicos (adaptado de Scalvert <i>et al.</i> , 2000 Manach <i>et al.</i> , 2005)	6
Tabela 2 – Exemplos de alguns alimentos e/ou bebidas adstringentes contendo taninos (Pickering e Bajec, 2008)	18
Tabela 3 – Sequencia das aPRPs (Inzitari <i>et al.</i> , 2005)	34
Tabela 4 – Característica dos genes PRP: Tamanho em pares de bases dos genes e seus respectivos mRNA transcritos (adaptado da base de dados <i>Ensembl</i>)	52
Tabela 5 – Quantificação de SNPs descritos por exão dos genes PRPs. Na tabela está representada o nome do gene, o exão e conteúdo em SNPs	53
Tabela 6 – Lista dos exões seleccionados para amplificação. Na tabela está representada o nome do gene, o exão, e conteúdo em SNPs	55
Tabela 7 – Lista de <i>primers</i> utilizados para amplificar os exões acima seleccionados. Na tabela está representada o nome do <i>primer</i> (F – <i>Forward</i> ; R – <i>Reverse</i>), a sequência, a temperatura de <i>annealing</i> e o tamanho do amplicão	56
Tabela 8 – Listagem, correspondência e caracterização dos SNPs encontrados nas sequências obtidas através do método de Sanger	65
Tabela 9 – Comparação da frequência alélica da população em estudo com a frequência alélica descrita na Europa e no Mundo (<i>Ensembl</i> , 2013)	67

Lista de abreviaturas e símbolos

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	<i>Base pair</i>
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EtBr	Brometo de etídio
g	Gramma
G	Guanina
H ₂ O	Água
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
Mg ²⁺	Ião magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar

°C	Graus Cécius
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Timina
Ta	Temperatura de annealing
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de melting
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
V	Volt

Códigos de uma letra e de três letras dos aminoácidos

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

I. Introdução

1. Introdução

1.1. Compostos fenólicos na alimentação - importância

O grupo dos compostos fenólicos (Fig.1) é dos mais abundantes nas plantas. Estes compostos são produzidos amplamente por todas as plantas sendo também considerados o grupo de fitoquímicos mais diversos, sendo derivados da fenilalanina e tirosina (Shahidi e Naczk, 2004). São definidos como substâncias possuindo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo os seus grupos funcionais e onde são incluídos os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzoicos e cinâmicos), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (Cabrita *et al.*, 2003; Bennick, 2002; Shahidi e Naczk, 2004). O grupo mais diverso em termos estruturais e o mais abundante na natureza é o grupo dos flavonoides que se podem dividir em várias classes de acordo com o grau de oxidação do anel C: chalconas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavonas, isoflavonas, auronas, antocianinas e antocianidinas (Scalbert e Williamson, 2000; Carvalho, 2007). Um derivado do grupo dos flavonoides, os flavan-3-óis, são provavelmente os mais abundantes constituindo a unidade fundamental das proantocianidinas - taninos condensados (Shahidi e Naczk, 2004, Carvalho 2007).

Considerados como uma das principais classes de metabolitos secundários nas plantas, os taninos possuem funções que vão desde a pigmentação e desenvolvimento até à defesa contra ataques microbiológicos e de predadores; isto é, são produzidos durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de *stress* como infeções, ferimentos, radiações UV, entre outras situações (Shahidi e Naczk, 2004; Naczk *et al.*, 2006; Carvalho, 2007).

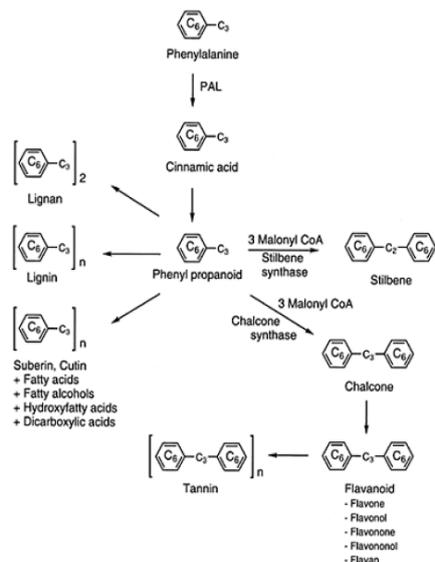


Figura 1 – Via metabólica de produção de fenilpropanóides (Shahidi e Nacz, 2004)

1.1.1. Características funcionais

Os compostos fenólicos possuem uma grande diversidade de funções sendo essenciais para o desenvolvimento, defesa e reprodução das plantas. De maneira mais específica, o seu envolvimento tem sido assinalado: em processos de resposta contra agentes patogénicos; como compostos antinutritivos; como componentes da parede celular; desempenhando também funções como agentes atrativos para polinizadores; em processos de sinalização; como agentes antioxidantes; e na proteção contra a radiação ultravioleta (Shahidi e Nacz, 2004; Messana *et al.*, 2004).

A considerável diversidade das estruturas químicas dos polifenóis diferencia-os de outros antioxidantes na medida em que afeta e diversifica igualmente as suas propriedades biológicas nomeadamente biodisponibilidade, atividade antioxidante, interações específicas com recetores celulares e enzimas, características sensoriais, etc.

1.1.2. Características sensoriais

Em termos de alimentação, os compostos fenólicos contribuem para as qualidades e características sensoriais tais como o sabor amargo, adstringência, cor, e

odor. Ainda na produção alimentar, os fenóis contribuem também para a estabilidade oxidativa dos produtos (Shahidi e Naczk, 2004; Lesschaeve e Noble, 2005).

As antocianinas estão incluídas no grupo dos flavonoides, e são responsáveis pela pigmentação da maioria das flores, frutos e folhas, variando de rosa-salmão ao vermelho e de violeta para azul-escuro. Algumas flavonas, flavonóis e chalconas contribuem também para os tons creme e amarelados de flores e frutos (Andersen e Jordheim, 2010; Carvalho, 2007). As antocianinas também podem ser visíveis nas raízes, tubérculos, caules, etc. Estas cobrem uma gama de estruturas com características únicas e são normalmente encontrados em solução no vacúolo das células vegetais (Andersen e Jordheim, 2010). São ainda moléculas com grande interesse económico sendo utilizadas como corante alimentar vermelho e violeta (E163) (Carvalho, 2007).

A adstringência provocada pelos compostos fenólicos pode ser percebida por uma grande variedade de alimentos nomeadamente em nozes, frutos, chocolates, chás, vinho e leite de soja. Isto deve-se principalmente aos polímeros de flavonóides - proantocianidinas ou taninos condensados (Lesschaeve e Noble, 2005). Assim, variações na composição de taninos condensados como o tamanho do polímero, adição de outros compostos e ainda a formação de derivados podem afetar significativamente a intensidade deste tipo de sensação (Lesschaeve e Noble, 2005; Moure *et al.* 2001).

Os compostos fenólicos são também capazes de capturar radicais livres e serem oxidados a quinonas. Estas características antioxidantes são muito úteis na indústria alimentar, pois permitem a conservação das propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos impedindo a oxidação e conseqüente formação de compostos nocivos para a saúde (Moure *et al.* 2001, Carvalho, 2007).

1.1.3. Efeito dos compostos fenólicos na digestão e na saúde

Os polifenóis têm vindo a despertar um grande interesse nos consumidores e nos produtores de alimentos. Este interesse surgiu devido a inúmeros razões, nomeadamente aos efeitos benéficos na saúde que têm vindo a ser comprovados e conseqüente prevenção de múltiplas doenças (cancro, doenças cardíacas, osteoporose, etc.). As principais fontes de polifenóis dietéticos são os frutos frescos e as bebidas (sumos de frutos, vinhos, chás, cafés, chocolates e cervejas), diferentes tipos de

vegetais, sementes, e frutos secos e cereais (Tabela. 1) (Manach, *et al.* 2004; Scalbert e Williamson, 2000; Carvalho, 2007; Naczk *et al.*, 2006).

Em pessoas com uma dieta rica em frutos e vegetais estima-se que este tipo de dieta permita a ingestão de cerca de 1g por dia de compostos fenólicos correspondente a: 61% - flavonóis, flavonas e flavanonas; 17% - antocianinas; e 20% - catequinas (Manach, *et al.* 2004; Scalbert e Williamson 2000).

Tabela 1 – Lista de alguns alimentos com teor em compostos fenólicos (adaptado de Scalbert *et al.*, 2000 Manach *et al.*, 2005).

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

É atualmente aceite o papel bastante relevante dos frutos, vegetais e vinhos tintos na prevenção de doenças sendo esse efeito, como já foi referido, atribuído em grande parte às propriedades antioxidantes dos seus constituintes polifenóis (em consumo moderado). Registos históricos relatam que importantes civilizações do mundo ocidental utilizavam o vinho como um remédio para o corpo e alma. De facto, estudos comprovaram que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes em produtos derivados da uva (essencialmente vinho tinto) são o principal mecanismo de defesa contra o efeito negativo dos radicais livres envolvidas na patogénese de inúmeras doenças. Assim, foi demonstrado que o consumo diário e moderado de vinho tinto, com a sua grande diversidade (cerca de 200) de polifenóis diferentes pode ajudar a prevenir doenças neurodegenerativas, cardíacas, vasculares cerebrais e periféricas, alguns tipos de cancro, diabetes, colesterol, infeções, etc. e ainda melhora o sistema circulatório e o sistema digestivo (Viccari *et al.*, 2009; Shahidi e

Naczk, 2004). Alguns aspectos negativos de uma dieta rica em fenóis têm também sido referidos. Vários estudos demonstraram que dietas com níveis elevados de taninos levam a vários efeitos negativos em herbívoros e mamíferos, tais como o aumento do risco de vários tipos de cancro, a redução da digestibilidade, danos na mucosa gastrointestinal, no epitélio, no rim ou insuficiência hepática, e a perda de azoto (Shimada, 2006; Shahidi e Naczk, 2004; Robbins *et al.*, 1987; Chung-MacCoubrey *et al.*, 1997; Shimada e Saitoh, 2003; Blytt *et al.*, 1988; Fowler e Richards, 1965).

1.2. Compostos fenólicos nos vinhos

Os compostos fenólicos são de extrema importância em enologia, pois estão relacionados com a qualidade dos vinhos (Cabrita *et al.*, 2003). Entre os frutos, o fruto da videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das maiores fontes destes compostos, principalmente flavonoides (antocianinas e flavonóis), estilbenos (resveratrol), ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzênicos) e uma grande diversidade de taninos (Francis, 2000; Viccari *et al.*, 2009).

1.2.1. Características funcionais, sensoriais e estruturais

Diversas funções importantes são levadas a cabo pelos compostos fenólicos no vinho (Fig.2). Em primeiro lugar, estes compostos provocam e alteram a adstringência; em segundo lugar, são responsáveis pela cor; e por último são a chave na preservação dos vinhos durante o seu envelhecimento. Assim, todas estas funções tornam os polifenóis os principais responsáveis pelas características tão variadas que este produto pode apresentar.

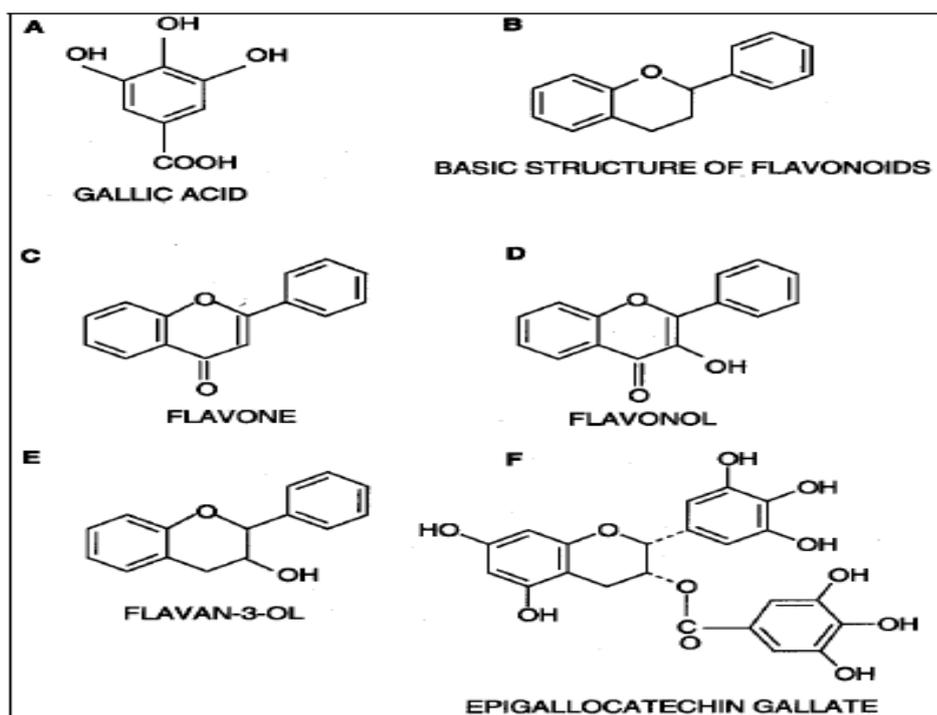


Figura 2 – Estrutura representativa de vários polifenóis (A – Ácido gálico; B – Estrutura básica dos flavonóides; C – Flavona; D – Flavonol; E – Flavan-3-ol (flavonóides); F - Epigallocatequina galhato) (Bennick, 2002).

1.2.2. Compostos fenólicos não flavonóides - características

Este tipo de fenóis corresponde a substâncias mais simples tais como os ácidos benzoicos, os ácidos hidroxicinamil tartárico e outros derivados fenólicos importantes como os estilbenos, entre outros. Alguns destes compostos são produzidos em situações de stresse (ex. ataque patogénico) como os estilbenos, e ainda apresentam importantes propriedades antioxidantes. (Fig.3) Localizam-se normalmente nas células do epicarpo e por isso existem em maior abundância nos vinhos tintos (Viccari *et al.*, 2009).

condensados e taninos hidrolisáveis (Waterhouse, 2002). Fazem parte da classe de ácidos benzoicos os ácidos vanílico, siríngico e salicílico (Di Stefano, 1996).

- Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são oligómeros ligados na forma de ésteres de ácido gálico ou ácido elágico com glucose ou outros açúcares. Este tipo de tanino não existe nas uvas mas pode surgir nos vinhos quando estes são armazenados e envelhecidos em cascos de carvalho pois fazem parte da madeira (Cabrita *et al.*, 2003).

- Estilbenos

Os estilbenos, tal como os ácidos benzoicos, constituem outra classe menor nos vinhos. O principal estilbeno presente nos vinhos é o resveratrol que é produzido pelas vinhas em resposta a ataques de fungos. Existem várias formas de resveratrol (isómeros *cis* e *trans*) encontrados nos vinhos e a sua presença tem sido associada a vários efeitos benéficos na saúde humana, nomeadamente redução de doenças cardíacas e cancerosas (Waterhouse, 2002).

1.2.3. Compostos fenólicos flavonóides - características

Os flavonóides são definidos especificamente por possuírem um esqueleto comum de 3 anéis (C6-C3-C6) com uma estrutura básica que consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel de pirano (Cabrita *et al.*, 2003). Estão descritos mais de 4000 flavonóides constituindo a maior e mais diversa família de polifenóis que se distinguem segundo o grau de oxidação do anel pirano (Cabrita *et al.*, 2003; Bennick, 2002). Os flavonóides possuem propriedades antioxidantes resultantes da captura de radicais livres produzidos por vários fatores bióticos e abióticos, como sejam a radiação ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias. A grande maioria dos compostos fenólicos nos vinhos tintos são os flavonóides extraídos do epicarpo e das sementes das uvas durante os processos de maceração e fermentação (Waterhouse, 2002).

Neste grupo encontram-se, entre outros, os taninos e as antocianinas, sendo os taninos particularmente importantes na interação com outros organismos devido ao seu efeito adstringente. No vinho, estes flavonóides são os principais compostos fenólicos

envolvidos nos processos de oxidação que se traduzem por alterações de cor e pela evolução da adstringência (Cabrita *et al.*, 2003).

Neste grupo incluem-se, os flavanóis (flavanóis-3), os flavonóis e as antocianinas.

- Flavanóis

Os flavanóis são a classe mais abundante de flavonóides nas uvas (epicarpo e sementes) e nos vinhos. Muitas vezes chamados de flavanóis-3, os níveis destes compostos são muito afetados pelas técnicas usadas de extração e maceração (Waterhouse, 2002).

Os compostos fenólicos mais importantes e os mais abundantes nos vinhos tintos provêm desta classe através da condensação dos monómeros de catequina com a consequente formação de oligómeros (proantocianidinas) e polímeros (taninos condensados). Relativamente aos taninos condensados, as suas unidades predominantes são as epicatequinas das uvas e do vinho, seguidas das catequinas. Como referido anteriormente, estes compostos provocam a adstringência dos vinhos que, com o envelhecimento, vai sendo reduzida; isto é, ao longo dos anos ocorrem reações de oxidação nos vinhos que levam à continuação da polimerização dos taninos condensados até que se tornam insolúveis e formam precipitados (muito comuns em vinhos tintos velhos). O resultado deste processo é uma redução dos teores em compostos fenólicos com o envelhecimento (Waterhouse, 2002).

- Flavonóis

Presentes na película (epicarpo) da uva, são sempre encontrados na forma de glicosídeos.

- Antocianinas

É bem conhecido que as antocianinas são os compostos mais importantes no que se refere à tonalidade dos vinhos e das uvas, pois são os principais pigmentos das flores e dos frutos (Cabrita *et al.*, 2003, Carvalho, 2007). Derivam das antocianidinas e ocorrem em todos os tecidos das plantas superiores.

Durante a maturação, através de diversas reações químicas (oxidação-redução, adição e de complexação), ocorre a modificação estrutural das antocianinas que se traduz na alteração da cor do vinho (Carvalho, 2007). São compostos praticamente inodoros e insípidos, contribuindo de forma moderada para a sensação de adstringência (Andersen e Jordheim, 2010).

1.3. Taninos

Os taninos estão largamente distribuídos nas várias partes das plantas. Divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Fig. 4), estes compostos têm a importante capacidade de interagir com as proteínas salivares e os polissacarídeos provocando a sensação de adstringência – perda do efeito de lubrificação da saliva levando a um conjunto complexo de sensações gustativas (descrito posteriormente) (Shimada, 2006; Cabrita *et al.*, 2003). No entanto, essa complexidade parece resultar num efeito protetor contra os taninos dietéticos através da precipitação das proteínas induzida pelos taninos (Soares *et al.*, 2011). De facto, os taninos são os compostos fenólicos mais polimerizados e apresentam uma grande afinidade com as proteínas traduzindo-se num efeito antinutricional. Isto ocorre devido à capacidade dos taninos inibirem enzimas envolvidas no metabolismo de vários compostos (carboidratos, lípidos e proteínas) o que torna a sua absorção mais árdua (Carvalho, 2007). Os taninos são assim considerados compostos com efeitos nocivos devido ao seu papel como antimetabolitos. Assim, a sua complexação pelas proteínas salivares faz destas a primeira linha de defesa contra os potenciais efeitos negativos dos taninos na dieta (Carvalho, 2007).

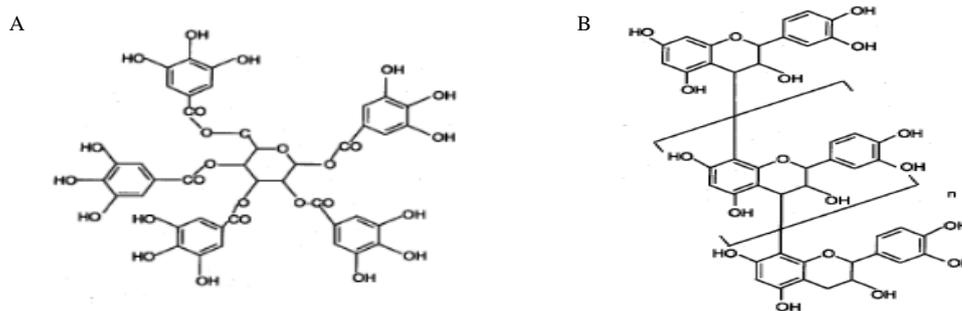


Figura 4 – Estrutura representativa dos taninos (A – Pentagalolilglucose; B – Estrutura básica dos taninos condensados) (Bennick, 2002).

1.3.1. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis resultam da ligação de um açúcar (geralmente glucose) a um composto fenólico, principalmente ácido gálico ou ácido elágico. Este tipo de taninos é abundante nas dicotiledóneas como o castanheiro e o carvalho que são utilizados como fonte industriais de tanino e utilizadas com frequência para fazer os cascos onde os vinhos são normalmente envelhecidos (Carvalho, 2007). Como o nome indica, estes taninos são facilmente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas, bem como por enzimas esterases (Bennick, 2002; Shimada, 2006).

1.3.2. Taninos condensados

Em contraste, os taninos condensados, são também chamados de proantocianidinas porque produzem antocianidinas quando sofrem despolimerização em condições oxidativas. Estes compostos são oligômeros e polímeros de flavonóides (flavan-3-ol) com ligações simples C-C, solúveis em água e muito comuns em alimentos derivados de plantas (Bennick, 2002; Shimada, 2006). Os taninos condensados provenientes das uvas, como referido anteriormente, são polímeros de epicatequinas e catequinas unidas formando uma cadeia (Kennedy, 2008). Neste caso, os taninos podem possuir variações no tipo de unidade básica assim como no tamanho do polímero (Kennedy, 2008). Estes compostos estão presentes em grandes quantidades no epicarpo e nas sementes mas estes taninos são diferentes nos dois tecidos (Kennedy, 2008).

1.4. Interações Proteínas-Taninos: Tipo de interação e modelos de agregação proteína-tanino

A interação que ocorre entre os taninos e as proteínas é muito importante, sendo considerada a base da sensação de adstringência (Fig. 5). Com base na literatura, é aceite que a adstringência é induzida pelos taninos através da precipitação das proteínas, provocando a perda do efeito de lubrificação da saliva, sendo definida como um conjunto complexo de sensações gustativas como a secura da superfície oral e sensações de enrugamento (Bennick, 2002).

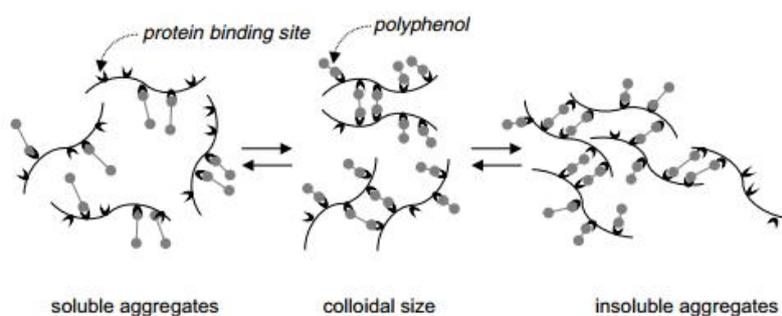


Figura 5 – Representação esquemática geral das etapas de interação e precipitação entre os polifenóis e as proteínas (Monteleone *et al.*, 2004).

A formação de complexos solúveis polifenol-proteína capaz de modular a viscosidade salivar, tem sido estudada e proposta como um fator que afeta a percepção sensorial, nomeadamente a adstringência (Monteleone, 2004; Clifford, 1997). Vários estudos procuraram mimetizar esta reação de interação polifenol-proteína que ocorre na cavidade oral produzindo respostas físico-químicas (Monteleone, 2004). Neste sentido, a reatividade dos polifenóis com várias proteínas *in vitro* foi muito usada (Monteleone, 2004; Bacon e Rhodes, 1998; de Freitas e Mateus, 2001; Edelman e Lendl, 2002; Sarni-Manchado *et al.*, 1999). As proteínas e polifenóis combinam-se formando complexos solúveis até possuírem um tamanho tal que irá levar à precipitação do complexo e consequente percepção da sensação de adstringência (Monteleone, 2004; Charlton *et al.*, 2002; Papadopoulou e Frazier, 2004). A formação destes complexos insolúveis precipitados é geralmente reversível. No entanto, outros processos como reações de oxidação, adição de iões metálicos, ou alterações de pH podem levar à irreversibilidade da sedimentação (Luck *et al.*, 1994; Bennick, 2002).

Vários autores têm mostrado que a medição da turbidez é uma técnica muito sensível e simples para medir a reatividade da proteína-polifenol a fim de determinar em que medida as unidades dos compostos fenólicos são capazes de interagir tanto com uma proteína modelo ou com proteínas salivares humanas (Monteleone, 2004; Horne *et al.*, 2002; Kallithraka *et al.*, 1998; Kallithraka *et al.*, 2001; Siebert, 1999).

As maiores afinidades observadas pelos taninos foram com proteínas, polipéptidos, e polímeros com elevado teor em prolina. Geralmente estas proteínas são de grande tamanho e não apresentam estrutura secundária ou terciária (Bennick, 2002). Para além das proteínas salivares, é sabido que os polifenóis também precipitam proteínas dietéticas e enzimas digestivas influenciando os efeitos fisiológicos e biológicos dos compostos fenólicos, dependendo da sua concentração e estrutura (Papadopoulou e Frazier, 2004). Esta variabilidade de afinidade entre proteínas e taninos possui consequências biológicas importantes (Bennick, 2002).

A natureza da interação tanino-proteína tem sido largamente estudada existindo evidências que ela pode ocorrer via ligação covalente ou iónica, interação hidrofóbica ou ainda através de ligações de hidrogénio (Bennick, 2002; Haslam *et al.*, 1991; Hagerman e Butler 1978; Oh *et al.*, 1980; Hagerman *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1994). Desta maneira vários estudos apontam que diferentes mecanismos, envolvendo estes tipos de interações, podem ser responsáveis pela ocorrência da precipitação dos taninos condensados e hidrolisáveis (Bennick, 2002). Este fenómeno poderá estar relacionado em grande parte com a grande quantidade de prolina presente nas proteínas com afinidade pelos taninos. Pois, este aminoácido apresenta forte tendência de ligação ao hidrogénio que pode levar a formações de interações hidrofóbicas secundárias (Fig. 6) (Hagerman *et al.*, 1998; Bennick, 2002).

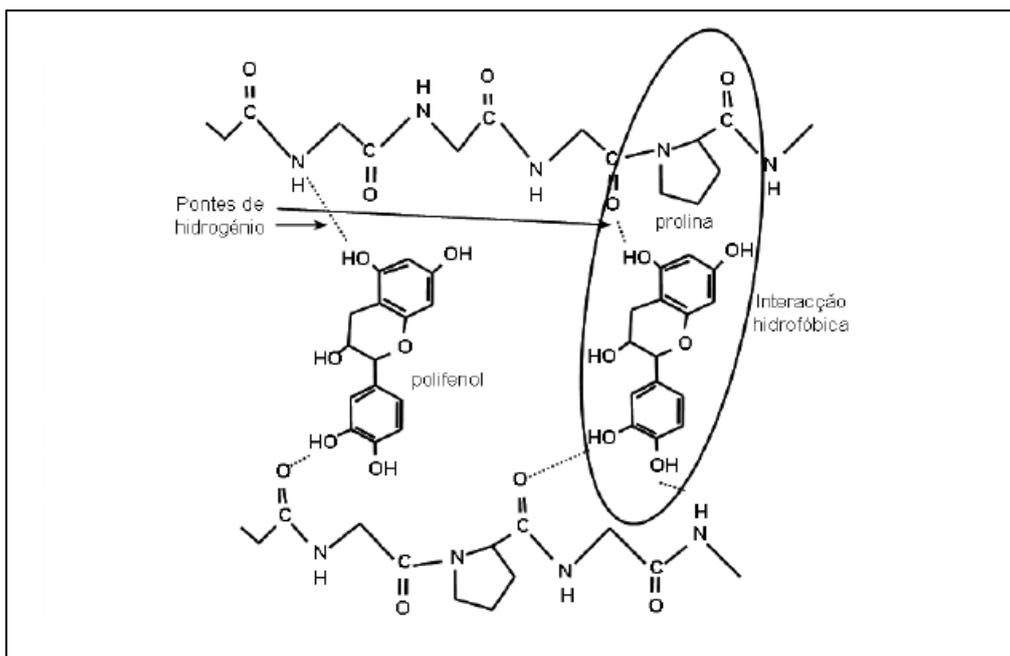


Figura 6 – Modelo representativo de possíveis interações proteínas-polifenóis (Asano *et al.*, 1982).

1.4.1. Adstringência

Embora difícil de definir, a adstringência não é um sabor mas uma sensação tátil resultante da interação de proteínas salivares com substâncias adstringentes traduzindo-se na precipitação de complexos substância-proteína. No caso dos vinhos, especialmente em vinhos tintos, a adstringência é provocada pela interação dos taninos (composto adstringente) com as proteínas salivares ricas em prolina (PRP).

A sociedade americana ASTM (The American Society for Testing and Materials) descreve a sensação de adstringência como “sensações complexas explicadas por contrações, fricção ou enrugamento do epitélio como resultado da exposição a substâncias como alúmen ou taninos” (2004). Na esmagadora maioria das publicações dedicadas a este assunto, os termos normalmente utilizados pelos autores para definir e explicar a percepção sensorial de adstringência são as sensações de *secura* (falta de lubrificação), *enrugamento/constricção* (sensação de contração dos tecidos na boca, lábios e interior das bochechas), e *aspereza/rugosidade* do epitélio (Lee *et al.*, 1991; Lawless *et al.*, 1994; Gawel, 1998; Simon *et al.*, 1992; Ishikawa e Noble, 1995; Jöbstl *et al.*, 2004; Breslin *et al.*, 1993; Lyman e Green, 1990; Bate-Smith, 1954). A exposição continuada a substâncias adstringentes leva a uma sensação mais prolongada e cada vez

mais pronunciada (Clifford, 1997). Assim, normalmente a adstringência não é apreciada de forma positiva levando a uma certa rejeição dos produtos que a provocam. No entanto, tem-se verificado uma certa habituação dos consumidores a esta percepção sensorial.

A adstringência desempenha um papel muito importante na experiência sensorial de uma grande variedade de alimentos e bebidas incluindo frutos (imatuross), chocolate, chá, vinho e cerveja. Na tabela 2 encontra-se a listagem de alguns alimentos e/ou bebidas adstringentes contendo taninos (Gawel, 1998; Pickering e Bajec, 2008).

Os compostos adstringentes são definidos como aqueles que possuem a capacidade de interagir e precipitar as proteínas. Para além dos polifenóis, existem mais três grupos de compostos adstringentes: sais de alumínio, agentes desidratantes (etanol e acetona) e ácidos orgânicos e minerais (Joslyn e Goldstein, 1964; Lawless *et al.*, 1994). É geralmente aceite que quanto maior for o grau de polimerização e peso molecular dos compostos adstringentes maior será a sua capacidade de precipitar proteínas e sua intensidade (Bate-Smith, 1973; Arnold *et al.*, 1980; Peleg *et al.*, 1999). Os polifenóis adstringentes possuem um peso molecular entre os 500 e 3000 Da (Bakker, 1998; Lesschaeve e Noble, 2005).

No entanto, como já referido, tem sido demonstrado que a intensidade da adstringência diminui com o aumento da polimerização dos polifenóis ao longo do amadurecimento dos frutos e o envelhecimento dos vinhos. Para explicar esta contradição, Ozawa *et al.* (1987), sugeriram que esta diminuição da intensidade adstringente não é devida a uma alteração nos polifenóis, mas sim a uma alteração noutras moléculas (e.g. pectina) que inibe a interação dos polifenóis com as proteínas salivares.

Tabela 2 – Exemplos de alguns alimentos e/ou bebidas adstringentes contendo taninos (Pickering e Bajec, 2008).

Proanthocyanidins (Condensed tannins)		Galloyl and hexahydroxydiphenoyl esters (Hydrolysable tannins)	
Common name	Species name	Common name	Species name
Apple	<i>Malus</i> sp.	Blackberry, Dewberry, Raspberry	<i>Rubus</i> sp.
Persimmon	<i>Diospyros kaki</i>	Walnut	<i>Juglans</i> sp.
Grape	<i>Vinus vinifera</i>	Strawberry	<i>Fragaria</i> sp.
Strawberry	<i>Fragaria</i> sp.	Carob pods	<i>Ceratonía siliqua</i>
Blackberry, Dewberry, Raspberry	<i>Rubus</i> sp.	Rose hip flower	<i>Rosa</i> sp.
		Pomegranate	<i>Punica granatum</i>
		Acorn	<i>Quercus</i> sp.
Plum, Cherry	<i>Prunus</i> sp.	Tea	<i>Camellia sinensis</i>
Bilberry, Cranberry	<i>Vaccinium</i> sp.	Uva-ursi	<i>Arctostaphylos uva ursi</i>
Gooseberry, Black and red currant	<i>Ribes</i> sp.	Paeony root	<i>Paeonia</i> sp.
		Geranium root – geranii Herba	<i>Geranium</i> sp.
Quince	<i>Cydonia</i> sp., <i>Chaenomeles chinensis</i>	Smoke-tree	<i>Cotinus coggyria</i>
		Cloves-flower buds	<i>Eugenia caryophyllata</i>
Cocoa bean	<i>Theobroma cacao</i>	Witch hazel	<i>Hamamelis</i> sp.
Kola nut	<i>Cola acuminata</i>	Kinimizuhiki	<i>Agrimonia japonica</i>
Pear	<i>Pyrus</i> sp.	Ohebi-ichigo	<i>Potentilla kleiniana</i>
Hawthorn	<i>Crataegus</i> sp.	Kibushi-leaves & fruit	<i>Stachyris praecox</i>
Rose hip	<i>Rosa</i> sp.	Rhubarb	<i>Rhei rhizoma</i>
Chinese gooseberry	<i>Actinidia chinensis</i>	Casuarina	<i>Casuarina stricta</i>
Yam	<i>Dioscorea alata</i>	Sweet gum leaves	<i>Liquidambar</i> sp.
Sorghum	<i>Sorghum</i> sp.	Pistacio	<i>Pistacia vera</i> , <i>P. chinensis</i>
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	Guava	<i>Psidium guava</i>
Sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Nupharis rhizoma	<i>Nuphar japonicum</i>
Herbaceous legumes	<i>Lotus</i> sp., <i>Trifolium</i> sp. <i>Coronilla varia</i> , <i>Lespedeza cuneata</i> , <i>Lathyrus pratense</i>	Bergenia leaves & roots	<i>Bergenia crassifolia</i> , <i>B. cordifolia</i> , <i>B. purpurascens</i>
Heather	<i>Calluna vulgaris</i>	Acacia leaves	<i>Acacia miltotica</i>
Wattle	<i>Acacia</i> sp.	Myricaceae bark	<i>Myrica rubra</i>
Rhubarb	<i>Rhei rhizoma</i>	Persimmon	<i>Diospyros kaki</i>
Polygonum multiflorum root	<i>Polygonum multiflorum</i>	Myricaceae bark	<i>Myrica rubra</i>
Myricaceae bark	<i>Myrica rubra</i>		

O mecanismo exato da adstringência ainda não está bem compreendido, mas é sabido que vários fatores contribuem para este processo. De facto, a adstringência parece estar diretamente associada com o teor em antocianinas e proantocianidinas (Arnold e Noble, 1978; Noble, 1990; Gawel, 1998; Vidal *et al.*, 2003; Del Llaudy *et al.* 2008). Nos vinhos, a composição em compostos fenólicos é uma das principais determinantes da sua qualidade (Del Llaudy *et al.* 2008). De facto, os vinhos tintos considerados de elevada qualidade possuem um nível muito equilibrado de adstringência (Gawel, 1998).

Gawel (1998) desenvolveu uma roda das sensações orais para auxiliar a identificação da ampla gama de sensações desencadeadas pelo vinho tinto (Fig.7). Nesta, são listados 33 termos diferentes usados para definir a adstringência.

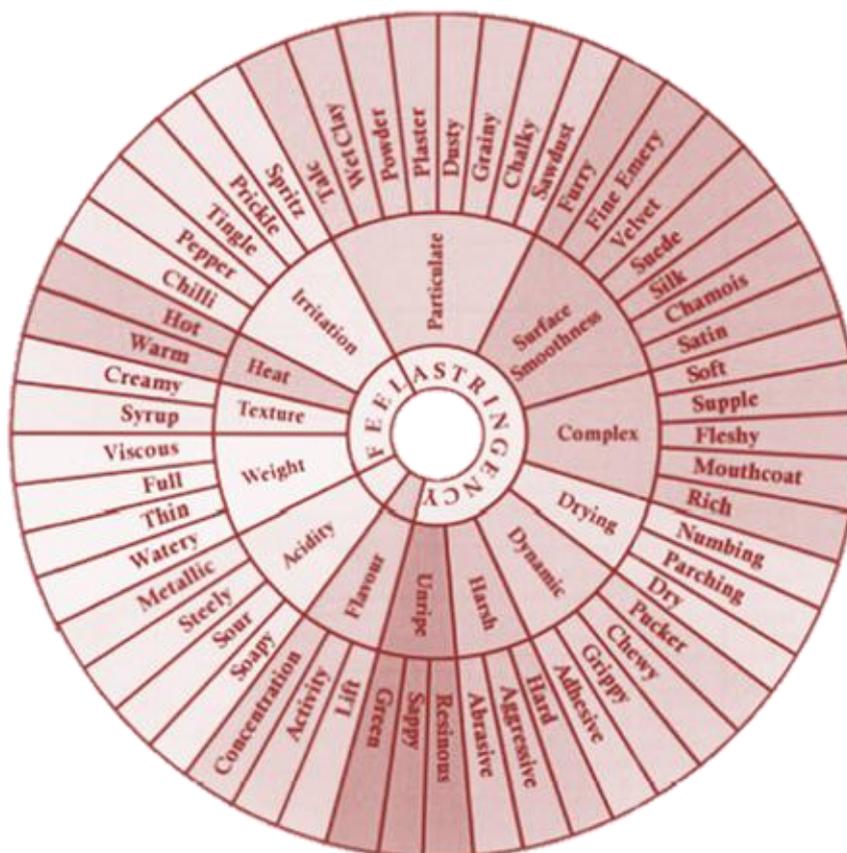


Figura 7 – Roda das sensações orais (Gawel, 2000; Pickering e Bajec, 2008).

A resposta fisiológica dos indivíduos durante a degustação do vinho irá influenciar o modo como percebem a sensação de adstringência, pois a taxa de fluxo salivar, viscosidade e composição proteica variam entre as pessoas (MCRae e Kenndy, 2011).

1.4.1.1. Proteínas salivares

A saliva é uma mistura de secreções de fluídos provenientes das glândulas salivares maior (parótida, submandibular e sublingual; (Fig.8) e menor, do sulco gengival, existindo ainda bactérias e alguns detritos celulares (Soares *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2009). Estes diferentes tipos de glândulas diferem consideravelmente tanto no conteúdo das secreções como no modo como são afetadas e estimuladas.

Fatores como a dieta, altura do dia, idade, género, doenças e ainda agentes farmacológicos podem condicionar a atividade destas glândulas (Soares *et al.*, 2011).

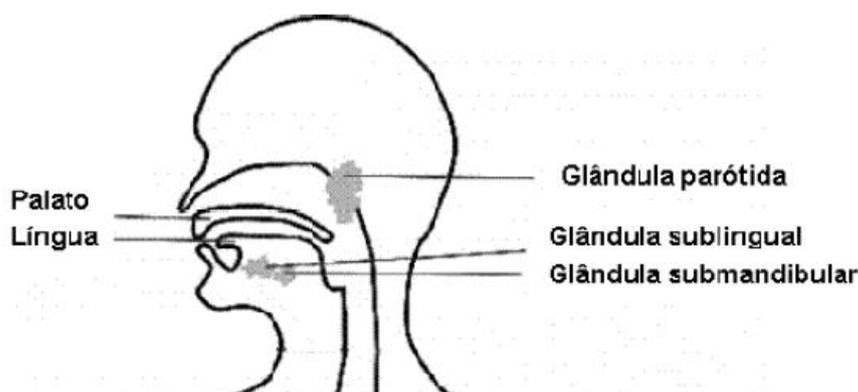


Figura 8 – Esquema representativo da localização das glândulas maioritárias (Carvalho, 2007).

De modo geral, a saliva é constituída por várias proteínas, eletrólitos e compostos orgânicos de baixo peso molecular (Soares *et al.*, 2011). As proteínas salivares encontram-se em grande abundância variando consideravelmente entre indivíduos na sua composição (Jenzano *et al.*, 1986; Lu e Bennick, 1998; Asikyan, 2005). Estudos recentes de proteômica, identificaram 437 proteínas salivares (Xie *et al.*, 2005). Todas estas proteínas possuem uma variedade de funções a nível fisiológico relacionadas com o armazenamento iónico, ação lubrificante e de tamponização e processos digestivos. São também importantes como agentes protetores desempenhando uma importante atividade antimicrobiana na agregação de microrganismos e na proteção da superfície dentária. No entanto, apenas algumas destas proteínas salivares estão envolvidas na sensação de adstringência como as proteínas ricas em prolina (PRPs), as histatinas (HRPs), entre outras (Lu e Bennick, 1998; Yann e Bennick, 1995; Gambuti *et al.*, 2006; Condelli *et al.*, 2005; de Freitas e Mateus, 2001). Algumas destas proteínas são moléculas muito importantes de baixo peso molecular presentes no fluido salivar que muitos autores denominam de péptidos salivares e estão agrupadas quanto à sua estrutura em 6 grupos (Soares *et al.*, 2011): 1) histatinas, 2) PRPs proteínas ricas em prolina básicas (bPRPs), 3) PRPs acídicas (aPRPs), 4) PRPs glicosiladas (gPRPs), 5) estaterinas e 6) cistatinas.

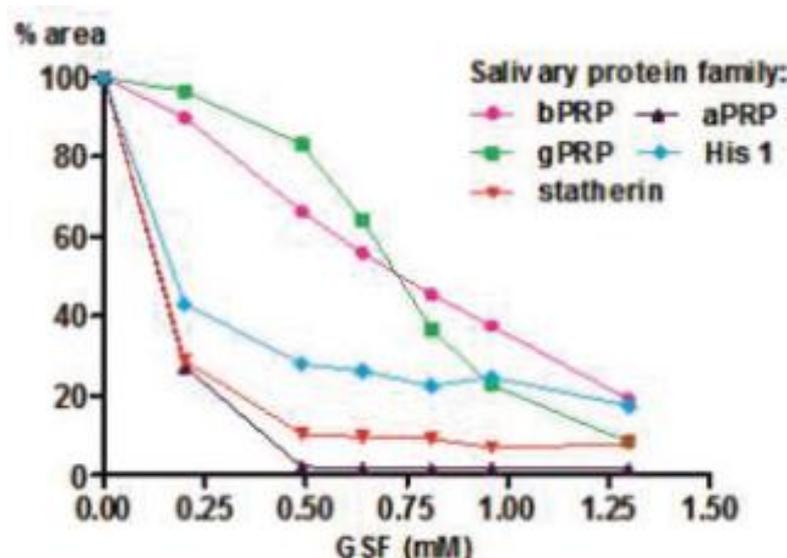


Figura 9 – Percentagem de redução da concentração de proteína livre para cada família de proteínas salivares (interação com taninos condensados extraídos (GSF)) (Soares *et al.*, 2011).

Numa abordagem proteómica, estudos realizados por Soares *et al.* (2011) tiveram como objetivo identificar o grau de afinidade de cada uma das proteínas acima referidas com polifenóis alimentares (uvas), nomeadamente os taninos (Fig.9). Os resultados mostraram que a classe das aPRPs e as estaterinas interagem de forma muito rápida e efetiva com os taninos relativamente às restantes classes. No entanto, as gPRPs apenas apresentam uma interação significativa quando os taninos se encontram em concentrações elevadas, ao contrário das bPRPs cuja interação é relativamente reduzida. Deste modo, no trabalho que se pretende realizar, dar-se-á ênfase a estas proteínas com um destaque especial às PRPs visto que a sua interação com os taninos é bastante significativa.

Estaterinas

As estaterinas são codificadas pelo gene *STATH* (isoformas: α e β) (www.ncbi.nlm.nih.gov) e são produzidas e libertadas pelas células acinares da glândula salivar parótida (Soares *et al.*, 2011). Além da interação com os taninos, esta proteína desempenha várias outras funções protetoras na cavidade oral tendo a particularidade de inibir a precipitação ou cristalização do fosfato de cálcio mantendo o seu equilíbrio de concentração na saliva supersaturada (Fábián *et al.*, 2012). Para além disso, protege a superfície oral da formação de película, apresenta atividade antibacteriana e antifúngica

(Fábián *et al.*, 2012) e também atua como lubrificante da superfície dentária (Ramasubbu *et al.*, 1993).

1.4.1.2. Proteínas Ricas em Prolina (PRPs)

As PRPs salivares são uma família polipeptídica que representa a maior fração das proteínas salivares totais (cerca de 70%) e a principal secretada pelas glândulas parótida e submandibular (Messana, 2004; Carvalho, 2007; Pickering e Bajec, 2008). O aparecimento de tais quantidades destas proteínas na saliva sugere funções biológicas na cavidade oral ou no trato gastrointestinal (Carvalho, 2007). Além dos humanos, elas estão também presentes na saliva e glândulas salivares de macacos, ratos, ratinhos, hamsters, coelhos, porcos e de veado (Bennick, 2002).

Como o nome sugere, o teor em prolina das PRPs é bastante elevado, geralmente acima dos 20% do teor total de aminoácidos (em humanos ~ 40%) (Shimada, 2006). Estas proteínas apresentam também um grande teor de resíduos de glicina, glutamina e glutamato. Estes aminoácidos, especialmente a prolina, previnem as proteínas de formar estruturas secundárias permitindo a ligação das PRPs a uma vasta gama de taninos com várias formas e tamanhos.

Mais de 20 PRPs estão presentes na saliva humana e, como já foi referido, são as mais vulgarmente estudadas em análises de adstringência na medida em que interagem com os polifenóis precipitando-os (Hagerman, e Butler, 1981). Esta família de proteínas divide-se em 3 classes: aPRPs, bPRPs e gPRPs, conforme referido anteriormente (Bennick, 2002; Messana, 2004; Shimada, 2006; Soares *et al.*, 2011; MCRae e Kennedy, 2011). São conhecidas 11 isoformas de bPRPs (IB1, IB4, IB5, IB6, IB7, IB8a, IB8b, IB8c, IB9, II-1 e II-2), uma gPRP (gPRP) e 5 aPRPs (PRP-1, PRP-2, PIF-s, Pa e Db-s) (Bennick, 2002; Soares *et al.*, 2011; Inzitari *et al.*, 2005). Todos estes membros da família das aPRPs representam aproximadamente 30% do total das PRPs e, estruturalmente, possuem duas regiões principais: o núcleo da região C-terminal, que compreende entre 70-80% da molécula, e a região N-terminal muito ácida (Shimada, 2006; MCRae e Kennedy, 2011). A nível estrutural, a região C-terminal das bPRPs é equivalente à das aPRPs. No entanto, a região N-terminal das aPRPs tem baixos níveis de prolina e, assim, o teor deste aminoácido da proteína é mais elevado em bPRPs do

que em aPRPs (Shimada, 2006). Alguns estudos indicaram que, nos seres humanos, as bPRPs perfazem cerca de 23% da concentração total de PRPs na saliva e são libertadas apenas pelas glândulas parótidas enquanto as aPRPs são secretadas por qualquer uma das glândulas salivares, incluindo as da parótida, submandibular e sublingual (Shimada, 2006; MCRae e Kennedy, 2011). Por fim, as gPRPs, são as menos abundantes incorporando apenas 17% das PRPs sendo responsáveis pela lubrificação e atividade antibacteriana (Shimada, 2006).

1.4.1.3. Interação taninos e PRPs

No sentido de perceber melhor a interação entre polifenóis e proteínas salivares, resultando na sensação de adstringência, Jöbstl *et al.* (2004) desenvolveu um modelo com os 3 diferentes estágios de interação e precipitação dos complexos polifenol-PRP (Fig.10). Numa primeira fase, as PRPs ligam-se aos taninos na cavidade oral. De seguida, a ação dos polifenóis leva à agregação de proteínas até formar grandes complexos (3ª fase) e ocorrer assim precipitação. Esta elevada afinidade permite aos taninos ligarem-se preferencialmente às PRPs mesmo na presença de quantidades excessivas de outras proteínas (enzimas ou proteínas das membranas epiteliais e das mucosas) de afinidade mais reduzida. Deste modo, a função das PRPs é de grande importância na medida em que previne a ligação dos taninos a estas proteínas secundárias impedindo a sua degradação em compostos fenólicos nocivos. As PRPs são ainda capazes de formar complexos estáveis com os taninos presentes na cavidade oral e no trato gastrointestinal, sendo a maior parte dos complexos excretados nas fezes (Carvalho, 2007).

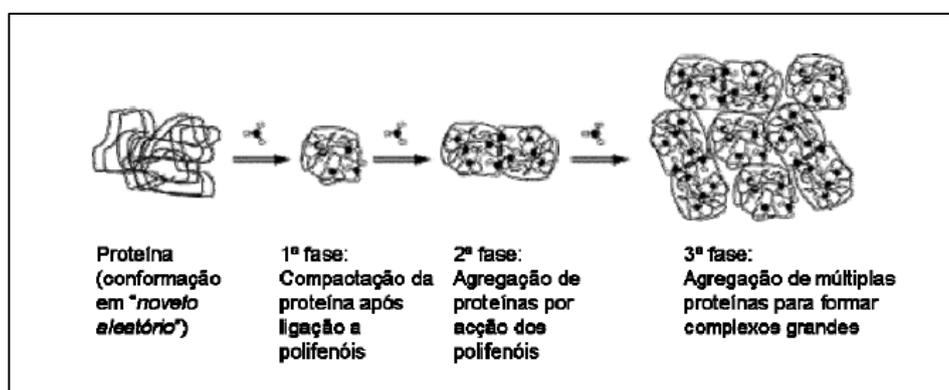


Figura 10 – Modelo em 3 fases da ligação PRPs com os polifenóis (Jöbstl *et al.*, 2004)

As PRPs apresentam maior afinidade pelos taninos condensados do que pelos taninos hidrolisáveis. A sua afinidade é também maior por polímeros do que por monómeros (Yokotsuka e Singleton, 1995; Baxter *et al.*, 1997). Tem sido também referido que as PRPs de maior tamanho demonstram maior afinidade para os taninos do que as PRPs de tamanho reduzido (Hagerman e Butler, 1981; Charlton *et al.*, 2002). A grande afinidade dos taninos com elevado tamanho e polimerização, tem sido atribuída à natureza multidentada dos polifenóis que permite que um único polifenol interaja com uma série de resíduos da proteína (Jöbstl *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 1997; Charlton *et al.*, 2002). No caso dos taninos hidrolisáveis, o grau de afinidade com as PRPs está diretamente relacionado com a percentagem de ésteres do ácido gálico, quanto maior for a percentagem destes ésteres maior é a sua afinidade para ligação as proteínas (Baxter *et al.*, 1997; Charlton *et al.*, 2002; Kawamoto *et al.*, 1995).

Várias investigações foram desenvolvidas com o objetivo de estudar a estabilidade dos complexos proteína-tanino. Estes complexos têm sido descritos como solúveis e insolúveis, dependendo das condições ambientais da reação (pH, quantidade de proteína, etc.) (Hagerman e Robbins, 1987; Kawamoto e Nakatsubo, 1997).

No estudo já mencionado de Soares *et al.* (2011), foi possível observar que as famílias de proteínas salivares que interagem com maior afinidade são as estaterinas e as aPRPs enquanto as bPRPs e as gPRPs interagem de modo dependente da concentração dos taninos. Para concentrações mais baixas de taninos a família de PRPs que interage menos são as gPRPs. No entanto, quanto maior for essa concentração, maior é a interação. Deste modo, concluiu-se que a concentrações mais altas de taninos, as bPRPs apresentavam a mais baixa interação em relação às outras duas famílias. Nesse mesmo estudo verificou-se que o aumento da concentração destes polifenóis (provenientes de uva) também aumentava a quantidade de proteínas salivares presentes no respetivo precipitado. Todas estas observações parecem indicar que estaterina e, especialmente as aPRPs, possuem uma elevada afinidade na formação de complexos com os taninos condensados em comparação com as outras proteínas salivares, num ensaio competitivo, a pH 5,0.

Normalmente, as PRPs têm estruturas abertas aleatoriamente enroladas que vão permitir a exposição de grupos carbonilo para a ligação de hidrogénio e também a exposição dos resíduos de prolina que atuam como locais de ligação para os taninos

(interação hidrofóbica da porção aromática do tanino com a prolina). Conseqüentemente, os resíduos de prolina, expostos e acessíveis, podem promover a interação hidrofóbica com os taninos. Também a presença de um número importante de grupos carboxilo no N-terminal dos resíduos ácido aspártico e glutâmico, pode contribuir de forma importante para reforçar a interação com taninos através de ligações de hidrogénio.

Em contraste com estes autores, Lu e Bennick (1998) quantificaram os taninos condensados (extraído de quebracho) precipitados por bPRPs, aPRPs e gPRPs a pH 7,4. Deste modo, a interação com taninos por parte das bPRPs era de longe a mais eficaz quando comparada com as outras PRPs.

As diferenças entre os resultados obtidos por Lu e Bennick (1998) e Soares *et al.* (2011) podem, de alguma maneira, refletir as diferenças nos taninos analisados. Além disso, o pH usado por Lu e Bennick (pH 7,4) é substancialmente diferente, o que provavelmente afeta de forma diferente esta interação pelas razões acima mencionadas (Soares *et al.*, 2011). Deste modo, é claro que em relação ao objetivo deste trabalho é de maior interesse os resultados obtidos através da utilização de taninos extraídos da uva.

1.4.1.4.As PRPs como primeira linha de defesa contra taninos dietéticos

A ingestão de grandes quantidades de taninos ou usados como tratamento para queimaduras e como adjuvantes, em humanos, podem causar carcinomas, hepatotoxicidade, e outros problemas patológicos e/ou tóxicos (Carlson, 1993).

Em herbívoros, a ingestão de taninos é conhecida como uma substância bastante tóxica provocando uma série de problemas gastrointestinais, bem como insuficiência renal e hepática, entre outros (Shimada, 2006). Para contornar estes problemas, os animais podem utilizar dois tipos de medidas preventivas: defesa de pré-ingestão e/ou pós-ingestão contra os taninos dietéticos (Shimada, 2006). A primeira consiste simplesmente em evitar alimentos contendo taninos. A segunda contramedida, utilizada por mamíferos e herbívoros, inclui várias ações como a secreção de proteínas salivares que interagem com os taninos, aumentar a produção de muco intestinal,

promover a degradação de taninos através dos microrganismos presentes na flora intestinal, ativação de enzimas desintoxicantes, e aumentar a capacidade da permeabilidade a glicoproteínas (Shimada, 2006; McArthur *et al.*, 1991; Dearing *et al.*, 2005).

Por estas razões, vários estudos sugerem que a elevada afinidade de interação permite às PRPs atuar como uma primeira linha de defesa contra os taninos (Shimada, 2006). Também foi demonstrado que, na maioria das espécies, a produção das PRPs é induzida pelos taninos e por β -agonistas. Em contraste, nos humanos, a síntese de PRPs é contínua e em níveis elevados (Shimada, 2006). Estes resultados sugerem que a síntese destas proteínas está efetivamente ligada à uma função de defesa contra estes polifenóis. Um aspeto também interessante foi a constatação que algumas modificações destas proteínas, tais como a glicosilação, podem reduzir a afinidade aos taninos (Shimada, 2006).

1.4.1.5. Fatores que influenciam a adstringência

Como já referido anteriormente, a intensidade da adstringência vínica pode ser alterada por uma série de fatores físicos e químicos: pH, sensações gustativas, fluxo salivar, tamanho, estrutura, solubilidade e concentração em polifenóis, força iónica, hidrofobicidade e glicosilação das proteínas interactuantes, temperatura, competição com antagonistas eficazes, etc.

Várias investigações foram desenvolvidas no sentido de elucidar as consequências destes fatores na perceção da adstringência. Os quatro fatores considerados mais importantes e ativos na alteração de tal sensação nos vinhos são abordados em seguida.

pH – Os ácidos orgânicos e inorgânicos são, só por si, compostos adstringentes (Gawel, 1998; Rubico e McDaniel, 1992; Hartwig e McDaniel, 1995; Sowalski e Noble, 1998; Corrigan e Lawless, 1995) exibindo perfis de adstringência diferentes e complexos (Lee e Lawless, 1991). No entanto, o pH afeta a perceção da intensidade da adstringência. Yokotsuka e Singleton (1987, 1995) verificaram que o pH elevado causa uma precipitação mais completa dos taninos provenientes da semente da uva pelas PRPs. Os complexos precipitados podem voltar a solubilizar quando

submetidos a um ambiente de pH de 2.5-4.0 (semelhante ao do vinho) (Jones e Mangan 1977). Estes resultados parecem indicar que adstringência percebida diminui à medida que o pH diminui. No entanto, o aumento da concentração de complexos solúveis, que ocorrem a pH baixo, pode diminuir a capacidade de lubrificação de saliva, resultando num aumento da adstringência (Gawel, 1998).

Sensações gustativas – As quatro qualidades gustativas aceites: doce, azedo, amargo e salgado; têm demonstrado interagir e influenciar a percepção de adstringência tanto físico como psicologicamente (Pickering e Bajec, 2008). Vários estudos concluíram que quase todos os compostos adstringentes também são amargos salientando as semelhanças entre estas duas sensações (Lea e Arnold, 1978; Ishikawa e Noble, 1995; Peleg *et al.*, 1999). Também, Lyman e Green (1990) e, mais tarde Smith *et al.* (1996), demonstraram que para o mesmo nível de doçura, a sacarose consegue praticamente erradicar a adstringência de forma muito mais eficaz do que o aspartame. Uma possível explicação é que as soluções de sacarose são mais viscosas do que soluções igualmente doces de aspartame. Estes resultados dão forte indicação de que o aumento da viscosidade de substâncias presentes no vinho, como o glicerol, pode reduzir a percepção da sua adstringência. Também o etanol e os polissacarídeos podem moderar a percepção da adstringência através do aumento da viscosidade (Van der Reijden *et al.* 1996).

Fluxo salivar – Foi demonstrado que o fluxo salivar de um indivíduo pode afetar a percepção da adstringência dos vinhos. Fischer *et al.* (1994) usaram vinho enriquecido em taninos e verificaram que indivíduos de alto e médio fluxo salivar percecionavam mais cedo a adstringência, com duração mais curta e menor intensidade, do que os indivíduos com baixo fluxo salivar. Mais estudos realizados por Ishikawa e Noble (1995) e Horne *et al.* (2002) confirmam estes resultados. Outros relatam não se verificar diferenças (Sowalsky e Noble, 1998) e/ou factos contraditórios na medida em que observaram maior intensidade de adstringência em indivíduos com elevado fluxo salivar (Peleg *et al.*, 1999).

Tamanho, estrutura, solubilidade e concentração em polifenóis – Como já vimos ao longo deste capítulo, o tamanho e a estrutura dos polifenóis são fatores diretos na influência da percepção da adstringência (ver Interação taninos e PRPs -1.4.1.3). Mas também a solubilidade e concentração destes compostos em água provou afetar a sua

associação com as proteínas. Em termos gerais, a solubilidade mais baixa favorece a formação destes complexos levando à maior intensidade da adstringência (Spencer *et al.* 1988). Presumivelmente, a hidratação relativamente fraca poderá apresentar uma entalpia de ligação mais favorável, devido a um menor número de ligações de hidrogénio que necessitam ser quebrados antes da interação (Gawel, 1998). Os complexos tanino-proteína já formados, por sua vez podem ser solúveis ou insolúveis.

1.5. Genes PRPs

As PRPs, nas glândulas salivares de mamíferos, são codificadas por uma família constituída por 6 genes, localizados no cromossoma 12, cujos membros divergiram em relação à estrutura e regulação da sua expressão. Assim, como já foi indicado, 70% das proteínas salivares pertencem a esta família única e multigénica de proteínas ricas em prolina (Bennick, 2002).

1.5.1. Estrutura e características dos genes PRP

Todas as proteínas provenientes dos genes PRPs são caracterizadas por 4 regiões principais: péptido sinal, região de transição, região de repetição e a região C-terminal (Fig.11).

A origem evolutiva comum dos genes PRP pode ser evidenciada a partir das extensas regiões conservadas 5' não traduzidas, das sequências de codificação e da organização exão/intrão. Na literatura, em vários estudos, é descrito que as diferentes classes de PRPs são codificadas pelos seguintes 6 genes divididos em duas subfamílias e que abrangem cerca de 700 kbp de DNA no cromossoma 12p13.2 (Carlson, 1993; Azen, 1993): Subfamília *HaeIII*: *PRH1*, *PRH2* e subfamília *BstNI*: *PRB1*, *PRB2*, *PRB3* e *PRB4*. Recentemente, alguns autores propuseram um mapa físico da família multigénica salivar de PRP humano e a ordem dos seis *loci* proposta foi: 5' *PRB2*, *PRB1*, *PRB4*, *PRH2*, *PRB3* e *PRH1* 3' (Carlson, 1993; Kim *et al.*, 1993).

1M L V V L F T V A L L A L S S	SIGNAL PEPTIDE
16A Q G P R E E L Q N Q I Q I P N Q R	TRANSITION REGION
34p P P S G F Q P R P P V N G S Q Q G	
52p P P P G G P Q P R P P Q G	REPEAT REGION
66p P P P G G P Q P R P P Q G	
80p P P P G G P Q P R P P Q G	
94p P P P G G P Q P R P P Q G	
108p P P P G G P Q Q R P P Q G	
122p P P P G G P Q P R P P Q G	
136p P P P G G P Q L R P P Q G	
150p P P P A G P Q P R P P Q G	
164p P P P A G P Q P R P P Q G	
178p P T T - G P Q P R P T Q G	
191p P P T G G P Q Q R P P Q G	
205p P P P G G P Q P R P P Q G	
219p P P P G G P Q P S P T Q G	
233p P P T G G P Q Q T P P L A G N T Q G	CARBOXYL TERMINUS
252p P Q G R P Q G P R STOP	
261	

Figura 11 – Sequência de aminoácidos da glicoproteína rica em prolina GP66sm codificada pelo gene MP2 de PRP de rato (Carlson, 1993).

Como se sabe, a complexidade ao nível das proteínas no sistema das PRP surge porque cada gene pode sintetizar mais do que uma proteína. Isto pode surgir devido a vários fatores. Em primeiro lugar, cada produto de gene pode gerar múltiplos PRPs por clivagens pós-traducionais. Além disso, em pelo menos um dos genes, o *splicing* alternativo resulta em transcrições múltiplas de diferentes comprimentos. Finalmente crossing-overs desiguais dentro das sequências repetitivas em tandem no terceiro exão originam alelos múltiplos em cinco dos seis *loci* de PRP (Kim *et al.*, 1993). Estes rearranjos são mais frequentes em genes da subfamília *BstNI* do que nos tipo *HaeIII* (possivelmente devido a um maior número de repetições em tandem no exão 3 em *BstNI*) e foram identificadas em todos os genes de PRP com a exceção do gene *PRH2* (Azen, 1993).

1.5.2. Genes *PRH1* e *PRH2*

Vários estudos referem que os genes das PRPs são semelhantes em estrutura. No caso das PRPs acídicas são expressas pelos dois *loci* *PRH1* e *PRH2* e formam a subfamília de tipo *HaeIII* na qual os locais para a enzima de restrição *HaeIII* ocorrem repetidamente (Fig.12) (Kim *et al.*, 1993).

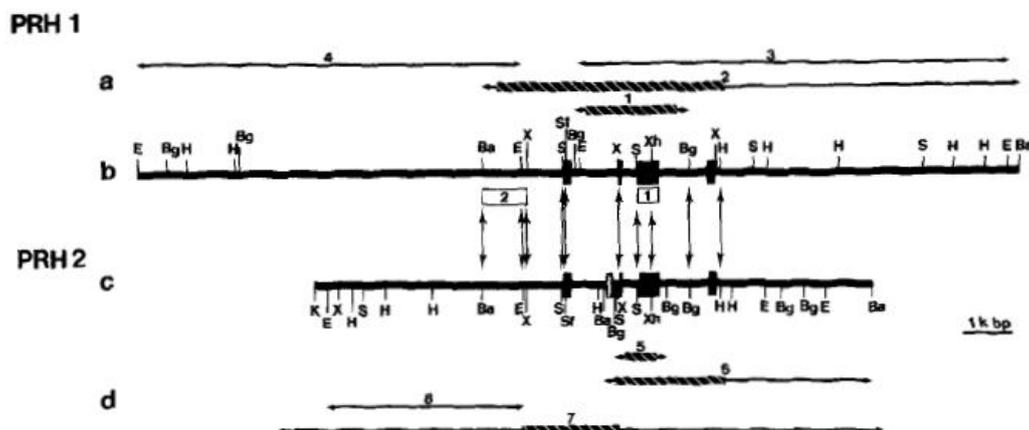


Figura 12 – Mapa de restrição dos genes *PRH1* e *PRH2* (Kim e Maeda, 1986).

O locus *PRH1* é responsável pela síntese das isoformas PIF-s, Pa e Db enquanto o locus *PRH2* origina as isoformas PRP-1 e PRP-2 (Inzitari *et al.*, 2005). *PRH1* e *PRH2* são altamente semelhantes e as sequências do terceiro exão diferem em apenas 0,2% (Carlson, 1993). Assim, Kim e Maeda (1986) verificaram que os primeiros três exões de ambos os genes têm igual comprimento, e o quarto exão apenas difere ligeiramente. A grande diferença entre os dois genes são os intrões sendo todos significativamente diferentes. Seguindo os resultados destes autores, os exões dos dois genes que codificam para as PRPs ácidas estão abaixo descritos:

Exão 1: 64 pb de comprimento; codifica a sequência de sinal secretora e os cinco primeiros resíduos N-terminal das aPRP.

Exão 2: localizado aproximadamente 1 kbp a jusante do exão 1, contém apenas 36 pb e codifica os próximos 12 resíduos da região N-terminal das proteínas.

Exão 3: localizado aproximadamente a 360 pb a jusante do exão 2, codifica a principal região repetida das duas proteínas em que as repetições de tipo *HaeIII* ocorrem em tandem cinco vezes. Estas regiões repetidas não são interrompidas pelos intrões. O códon de terminação TAA também ocorre no exão 3.

Exon 4: situada depois de uma longa sequência de intervenção de cerca de 1200 pb, contém apenas a região 3' não traduzida e a sequência sinal adicional poli (A): AATAAA (Fitzgerald e Shenk, 1981).

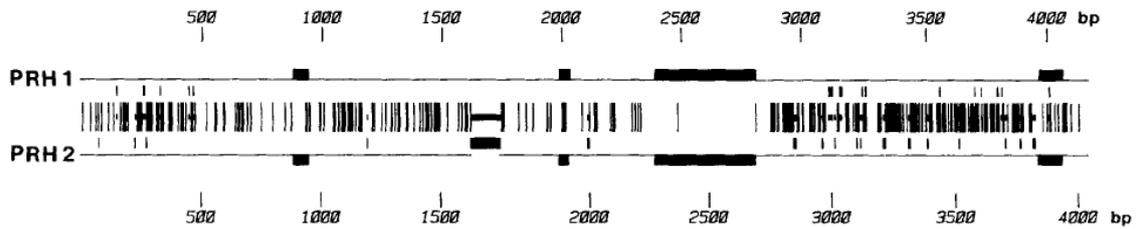


Figura 13 – Comparação das sequências dos genes *PRH1* e *PRH2* (Kim e Maeda, 1986).

As diferenças entre as sequências de nucleótidos dos dois genes do tipo *HaeIII* estão resumidas na figura 13, na qual as duas sequências se encontram alinhadas com os seus exões homólogos representados pelas barras pretas sólidas (Kim e Maeda, 1986). Assim, os autores deste estudo verificaram que a diferença total entre os dois genes é de 8,7% (onde cada divergência de base e cada lacuna é contado como uma única diferença). Aliás, a região repetida no exão 3, constituído por cinco repetições em série de 63 pb, é totalmente idêntica nos dois genes. Ainda se verificou que comparando os genes do tipo *HaeIII* e os genes do tipo *BstNI*, a diferença total entre as sequências consenso dos dois tipos de genes é de 19%. Estes resultados sugerem que a duplicação a partir de um único gene ancestral das PRPs salivares humanas, originando estes dois tipos de genes, não é recente (Kim e Maeda, 1986).

1.5.3. Genes *PRB1*, *PRB2*, *PRB3* e *PRB4*

A segunda subfamília que codifica as bPRPs e gPRPs consiste em quatro genes do tipo *BstNI*: *PRB1*, *PRB2*, *PRB3* e *PRB4*. Este tipo de genes *BstNI* possui uma região onde os locais de restrição *BstNI* ocorrem repetidamente (Kim *et al.*, 1993). Os mapas de restrição *BamHI*, *BglII*, *EcoRI* e *HindIII* das regiões de DNA onde estão localizados os quatro genes *PRB* estão ilustrados na figura 14, e as regiões sequenciadas estão indicadas pelas barras a tracejado. Através deste mapa também se pode observar o grau de parentesco entre as regiões destes genes e ainda as regiões que ocorrem em mais do que um gene, em particular nos genes *PRB1* e *PRB2*.

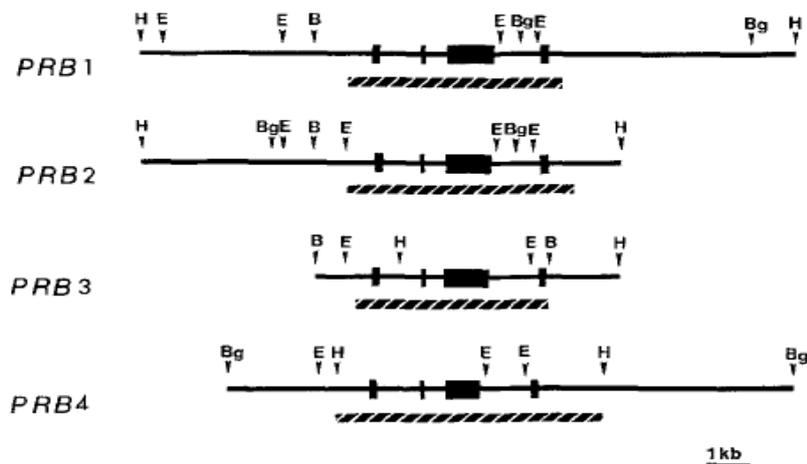


Figura 14 – Mapas de restrição das regiões dos genes *PRB1*, *PRB2*, *PRB3* e *PRB4*. Locais enzimáticos: *Bam*HI (B), *Bg*III (Bg), *Eco*RI (E), e *Hind*III (H). As barras a tracejado ilustram a região da sequência de cada gene (Kim *et al.*, 1993).

Estudos de polimorfismos genéticos realizados por Lyons *et al.* (1988) demonstram que os genes *PRB1* e *PRB2* partilham muitos locais de restrição enzimática na região 5'. Da mesma forma, os genes *PRB3* e *PRB4* possuem locais de restrição comuns também na mesma região. Assim, *PRB1* e *PRB2* formam um subtipo e *PRB3* e *PRB4* formam um segundo subtipo dos *loci PRB*.

Estudos das sequências de DNA deste 4 genes foram desenvolvidos por Kim *et al.* (1993). Como tal, com base nos resultados destes autores, todos os genes *PRB* apresentaram uma organização similar à dos dois genes *PRH*, com quatro exões e três intrões cujas características são descritos abaixo.

Exão 1: Possui um comprimento de 64 pb a partir do codão de iniciação (Met.). O gene codifica para uma sequência de sinal secretora de 16 aminoácidos e os cinco primeiros resíduos da região N-terminal.

Exão 2: está localizado aproximadamente a 1 kbp a montante do exão 1, contém 36 pb e codifica para os restantes 12 aminoácidos da região N-terminal.

Exão 3: localiza-se a cerca de 500 pb a jusante do exão 2 e é o maior dos exões possuindo 63 pb repetidas em tandem. Este exão carece da segunda região terminal presente nos genes *PRH*.

Exão 4: está localizada 1,2 kb a montante do exão 3. Este exão (varia em comprimento entre 86 pb e 117 pb nos seis genes) não é traduzido e contém uma sequência de sinal adicional poli(A).

1.5.4. Variabilidade genética

Os genes PRP são genes altamente variáveis possuindo cerca 9600 variações. O gene *PRB2* é o que possui mais variabilidade contando com cerca de 3414 variações e o que possui menos é o gene *PRH1* contendo apenas 287 variações (Fig.15) (www.ensembl.org). O tipo mais comum destas variações são os *SNPs* (*single-nucleotide polymorphisms*) e consistem então na variação da sequência de DNA que ocorre quando um único nucleótido (adenina, timina, citosina ou guanina) difere entre indivíduos de uma espécie ou entre cromossomas homólogos de um indivíduo. Existem vários fatores que determinam a densidade de SNPs como a taxa de mutação e recombinação. Assim, através da identificação de SNPs é possível avaliar a diversidade genética.

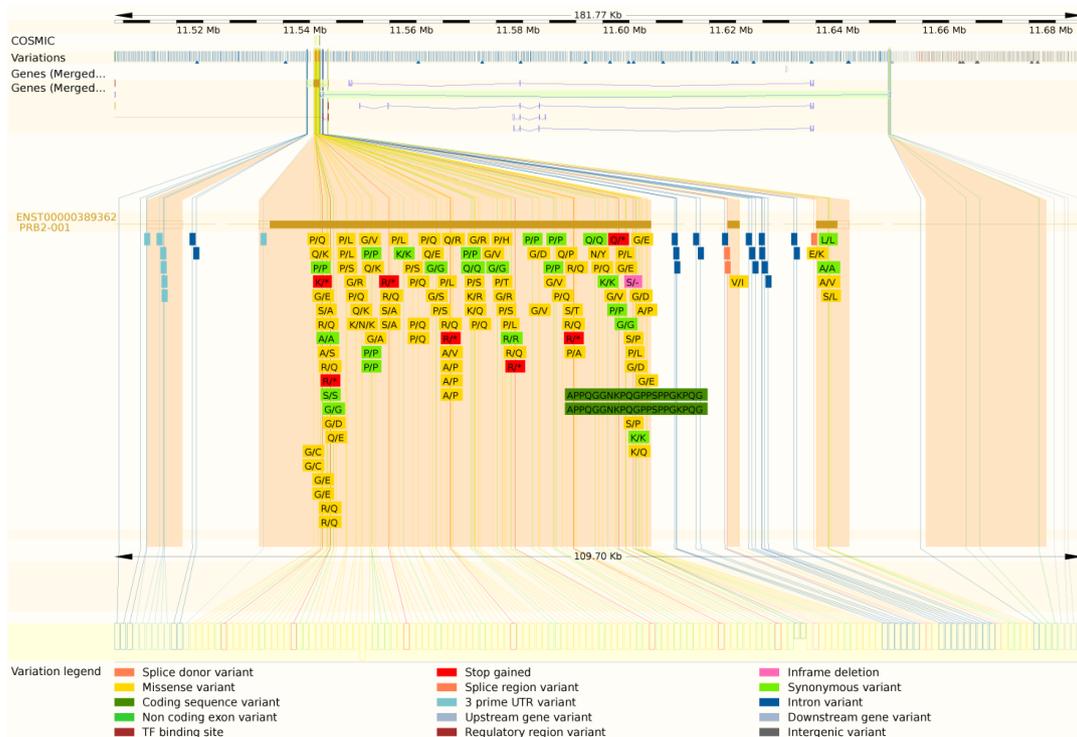


Figura 15 – Mapa de variação do gene *PRB2* (Proteína rica em Prolina da subfamília *BstNI 2*) (www.ensembl.org).

Eventos como a proteólise pós-translacional, mutações específicas, a substituição de uma única cisteína, recombinação homóloga e desigual dentro do cluster da família de gene PRP, e os SNPs são muito frequentes. Estes acontecimentos podem levar a grandes alterações nos tamanhos dos genes, ao aparecimento do gene *PRB2/1* (gene de fusão *PRB2/1* – exclusão da região *PRB1* e ausência das proteínas codificadas por este), interferência com a proteólise impedindo a geração de PRPs precursoras, mutações nulas, etc. (Azen, 1993).

É característico dos genes que codificam as bPRPs e gPRPs possuírem muitos alelos dando origem a um grande número de fenótipos (Lu e Bennick, 1998). Como já foi referido anteriormente, as PRPs (sobretudo as bPRPs) possuem várias isoformas (Bennick, 2002; Soares *et al.*, 2011; Inzitari *et al.*, 2005). As aPRP podem diferir umas das outras apenas de um aminoácido como por exemplo PRP-1 e PRP-2, assim como PRP-1 e PIF-s (Tabela.3) (Hay *et al.*, 1988; Inzitari *et al.*, 2005). Estas podem ainda sofrer clivagens proteolíticas originando uma sequência de 44 aminoácidos (péptido PC) e 4 diferentes isoformas truncadas (PRP-3, PRP-4, PIF-f e Db-F).

Tabela 3 – Sequencia das aPRPs (Inzitari *et al.*, 2005).

Db-s	10 <QDLNEDV <u>S</u> QE	20 DVPLVISDGG	30 D <u>S</u> EQFLDEER	40 QGPPPLGGQQS	50 QPSAGDGNQD	60 DGPQQGPPQQ
Pa	10 <QDLNEDV <u>S</u> QE	20 DVPLVISDGG	30 D <u>S</u> EQFLDEER	40 QGPPPLGGQQS	50 QPSAGDGNQD	60 DGPQQGPPQQ
PIF-s	<QDLNEDV <u>S</u> QE	DVPLVISDGG	D <u>S</u> EQFI DEER	QGPPPLGGQQS	QPSAGDGNQD	DGPQQGPPQQ
PRP-1	<QDLDEDV <u>S</u> QE	DVPLVISDGG	D <u>S</u> EQFI DEER	QGPPPLGGQQS	QPSAGDGNQN	DGPQQGPPQQ
PRP-2	<QDLDEDV <u>S</u> QE	DVPLVISDGG	D <u>S</u> EQFI DEER	QGPPPLGGQQS	QPSAGDGNQD	DGPQQGPPQQ
Db-s	70 GGQQQQGPPP	80 PQGKPPQGPPQ	90 QGQQQQQGPP	100 PPQGKPPQGPP	110 QQGGHPPPPPQ	120 GRPQGGPPQQG
Pa	70 GGQQQQGPPP	80 PQGKPPQGPPQ	Q -----	-----GGHPPPPPQ	90 GRPQGGPPQQG	
PIF-s	GGQQQQGPPP	PQGKPPQGPPQ	Q -----	-----GGHPPPPPQ	90 GRPQGGPPQQG	
PRP-1	GGQQQQGPPP	PQGKPPQGPPQ	Q -----	-----GGHPPPPPQ	90 GRPQGGPPQQG	
PRP-2	GGQQQQGPPP	PQGKPPQGPPQ	Q -----	-----GGHPPPPPQ	90 GRPQGGPPQQG	
	▼130 GHPRPPRGRP	140 QGPPQQGGHQ	150 QGPPPPPPGK	160 PQGPPPPQGGGR	170 PQGPPQQQSP	Db-s Q ← ▼ (DB-F)
Pa	100 GHPCPPRGRP	110 QGPPQQGGHQ	120 QGPPPPPPGK	130 PQGPPPPQGGGR	140 PQGPPQQQSP	150 Q
PIF-s	GHPRPPRGRP	QGPPQQGGHQ	QGPPPPPPGK	PQGPPPPQGGGR	PQGPPQQQSP	Q ← ▼ (PIF-F)
PRP-1	GHPRPPRGRP	QGPPQQGGHQ	QGPPPPPPGK	PQGPPPPQGGGR	PQGPPQQQSP	Q ← ▼ (PRP-3)
PRP-2	GHPRPPRGRP	QGPPQQGGHQ	QGPPPPPPGK	PQGPPPPQGGGR	PQGPPQQQSP	Q ← ▼ (PRP-4)

a) S = phosphorylated serine
< = pyroglutamic residue
▼ = cleavage generating PC peptide

Os Polimorfismos das bPRP e gPRPs incluem Pm / PmF (parotid middle band, fast), G1 (major parotid glycoproteins), Ps (parotid size variant), PmS (parotid middle band, slow), CON1 e CON2 (Concanavalin A-binding proteins), Pe e Po (Azen,

1993). Assim, *PRB1* codifica Pe (DEAE-II2), PinS (IB-6), PmF (IB-9) e Ps. *PRB3* codifica G1 e *PRB4* codifica Po (P-D) e, possivelmente, CON1 e CON2 (Azen, 1993).

Assim, cada produto de gene pode gerar múltiplos PRPs devido aos polimorfismos da sequência proteica e modificações pós-translacionais. Além disso, em pelo menos um dos genes, o *splicing* alternativo resulta em transcrições múltiplas de diferentes comprimentos. Finalmente crossing-overs desiguais dentro das sequências repetitivas em tandem no terceiro exão originam alelos múltiplos em cinco dos seis *loci* de PRP. Concluindo, os SNPs podem resultar nestes polimorfismos/modificações provocando uma pequena alteração na função das PRPs, o que poderá explicar este número considerável de fenótipos (Lu e Bennick, 1998; Whitelegge *et al.*, 2007).

II. Objetivos

2. Objetivos

Visto que cada individuo é diferente, as percepções sensoriais de cada pessoa também serão diferentes. Na realidade, sabe-se que existe uma elevada diversidade genética associada a estas percepções sensoriais, sendo que 90% dos polimorfismos pertencem à classe dos SNPs, que, portanto, são os principais responsáveis pela maioria das alterações fenotípicas.

Assim, o objetivo deste trabalho é implementar uma metodologia que estuda a diversidade genética das PRPs associada à percepção sensorial dos vinhos através da análise de polimorfismos da família de genes que as codificam. Neste trabalho, esta análise será focada numa população teste de 18 indivíduos.

III. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. *In silico* - Análise bioinformática

3.1.1. *Pesquisa das sequências genéticas e dos SNPs associados aos genes PRPs.*

Com base na literatura, verificou-se que existem 6 genes que codificam esta família de proteínas (Bennick, 2002; Maeda, 1985): 2 genes que codificam as aPRPs (*PRH1* e *PRH2*) e os restantes 4 codificam os bPRPs e gPRPs (*PRB1*, *PRB2*, *PRB3* e *PRB4*).

Depois de cada um dos genes ser identificado foi realizada uma pesquisa bioinformática na base de dados *Ensembl* onde foram recolhidas cada uma das sequências de DNA dos respetivos genes e todos os SNPs descritos a eles associados. Através do *software* BioEdit, versão 7.1.3.0, foi possível localizar cada um dos SNPs descritos na sequência do gene respetivo. Este processo permitiu assim gerar uma sequência, para cada um dos 6 genes, que reúne todos os SNPs descritos no seu local específico.

3.2. Colheita da amostra

Com o auxílio de uma zaragatoa foi recolhida uma amostra de saliva/células bucais de cada um dos 18 indivíduos voluntários, sob condições não estimuladas e após um mínimo de 30 min após a ingestão de alimento ou bebida de modo a reduzir a contaminação com impurezas.

3.2.1. *Extração de DNA*

Utilizando o kit de purificação de DNA genómico *Quick-gDNATM MiniPrep*, extraiu-se o DNA genómico das 18 zaragatoas contendo as amostras. A extração foi

realizada de acordo com o protocolo específico e uso dos reagentes presentes no kit. Assim, para cada amostra, deixou-se a zaragatoa em 500 µl de solução de lise (5-10 min.) que foi de seguida transferida para colunas de extração Zymo-Spin™. Esta foi centrifugada e adicionado 200 µl de Tampão DNA Pre-Wash. Após nova centrifugação, adição de 500 µl de tampão g-DNA Wash e outra centrifugação, o DNA foi finalmente eluído em 30 µl de tampão de eluição.

3.2.2. *Quantificação do DNA*

A quantidade e a qualidade das amostras de DNA foram determinadas através leitura da densidade ótica a 260nm e 280nm num espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (ThermoScientific), de acordo com as especificações do fabricante.

3.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.3.1. *Primers*

Para a amplificação específica e sensível dos exões selecionados desenharam-se *primers* (*forward* e *reverse*) para cada uma das regiões alvo. Para este desenho, utilizou-se o Oligo Explorer, versão 1.4, *software* bioinformático que gerou uma lista de possíveis *primers*. Para o desenho e seleção dos *primers*, foram definidos os seguintes critérios:

- Tamanho do amplicão - Os fragmentos de DNA a amplificar deveriam ter 800 pares de bases (pb).
- Tamanho dos *primers* – Devem apresentar idealmente entre 18 a 22 pb para que a probabilidade de hibridar com outras regiões, que não a desejada, seja reduzida.
- Temperatura de melting (*T_m*) - Temperatura à qual 50% das moléculas do conjunto *primer*/DNA estão desemparelhadas e as outras 50% ainda

hibridizadas. T_m pode ser estimada recorrendo à regra de Wallace dada pela fórmula $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ °C (G, C, A, T correspondem ao número de cada um dos nucleótidos no *primer*). Todos os *primers* foram desenhados de forma a que a diferença de T_m entre eles não ultrapassa os 2°C.

- Temperatura de *annealing* dos *primers* (T_a) - Temperatura à qual ocorre a hibridação dos *primers* com a cadeia de DNA molde é determinada com base na T_m , à qual são subtraídos 2° a 4°C (Chen e Janes, 2002; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Todos os *primers* foram desenhados de forma a terem aproximadamente a mesma T_a , entre 54 °C e 56 °C.

- Percentagem em GC (Guanina e Citosina) – Deverá ser entre 40%-60% aumentando assim a estabilidade da ligação do *primer* ao DNA, pois as ligações G-C são mais fortes e estáveis do que as ligações A-T.

- Formação de dímeros e auto-hibridização – Para todos os *primers* desenhados, de acordo com os critérios supra referidos, foi testada a probabilidade de formação de dímeros e de ocorrência de auto-hibridização. Deste modo, foram escolhidos, sempre que possível, os pares de *primers* que apresentavam baixa ou nenhuma probabilidade de formarem estas estruturas secundárias. Pois estas são produzidas por interações inter e intramoleculares, podem levar a uma fraca formação de produto de PCR.

Após o seu desenho, os *primers* foram encomendados à IDT, que os forneceu sob a forma liofilizada. Uma vez no laboratório, estes foram ressuspensos em tampão TE 1x a uma concentração final de 100 µM e guardados. Posteriormente, prepararam-se alíquotas diluídas, com uma concentração final de 10 µM, que foram utilizadas na preparação das reações de PCR.

3.3.2. Amplificação dos exões

As reações para a amplificação dos exões foram realizadas no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient). Prepararam-se reações de PCR para cada amostra de DNA e para cada par de *primer*. Para cada par de *primer* foi preparada uma mistura para um volume final de 25 µl, contendo 1x PCR Buffer (Bioron); 1,7mM

de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs (Bioron); 0,4μM de cada *primer*; 1U de *Taq* Polimerase (Bioron) e 10-40ng de DNA. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, formado por todos os compostos da reação, com exceção do DNA genómico, cujo volume foi substituído por água Milli-Q estéril.

Foi utilizado o seguinte programa de PCR: um período inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguido de um ciclo de 30 repetições de 30 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura de *annealing* do respetivo *primer*, 60 segundos a 72°C, e finalmente um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram conservados a 4°C até à sua resolução segundo a metodologia descrita em 3.4.

3.4. Deteção dos produtos de PCR - Eletroforese

A análise dos produtos resultantes da amplificação do DNA por PCR foi realizada e por eletroforese horizontal em géis de agarose. Prepararam-se géis de agarose a 1% (m/v) em TAE 1x, que foram corados com brometo de etídio numa concentração final de 0,3μg/mL. Por cada amostra, analisou-se 8μL do produto de reação de PCR e adicionou-se 2μL de tampão de deposição. Para verificar a amplificação com o tamanho pretendido, comparou-se o produto com um marcador molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). A eletroforese decorreu a 90V durante 30 minutos. Após a corrida de PCR, visualizaram-se os géis sob luz ultravioleta no Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad). As imagens geradas, foram adquiridas e analisadas através do programa Quantity One versão 4.6.3 (BioRad).

3.5. Purificação dos produtos de PCR

Após a amplificação, e antes de se proceder à reação de sequenciação, é necessário remover os reagentes em excesso resultantes da amplificação por PCR, como *primers* e dNTPs. Neste passo de purificação utilizou-se o Kit Ilustra Exostar (GE Healthcare). Este kit de purificação é composto por duas enzimas hidrolíticas – Exonuclease I e a Fosfatase Alcalina. A enzima exonuclease I degrada o DNA *single strand*, como os *primers*, no sentido 3'-5', libertando os desoxirribonucleotídeos

monofosfatados. Já a função da enzima Fosfatase Alcalina, é o de desfosforilar os dNTPs que não foram incorporados na reação de PCR e desfosforilar os dNMPs.

Nestas reações de purificação adicionou-se 0,7µL de cada enzima a 3,5 µL do produto de PCR em novos tubos de PCR de 0,2mL, posteriormente, colocaram-se os tubos no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient) a 37°C durante 15 minutos e de seguida, a 80°C durante 15 minutos. Após este passo de purificação os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados.

3.6. Genotipagem de SNPs - Método de Sanger

3.6.1. *Reação de sequenciação*

Neste trabalho, a sequenciação dos fragmentos de DNA de interesse foi obtida por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos descrita por Sanger *et al.* 1977. Para tal, foi utilizado o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) para as reações de sequenciação. Fez-se a reação de sequenciação para cada amostra de DNA e para o *primer forward* dos *primers* pares utilizados. Para cada *primer* foi preparada uma mistura para um volume final de 10µl, contendo 2µL de BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5x), 2µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction-100, 3,2pmol dos oligonucleotídeos *forward*, 4,9 µL do produto de PCR purificado e 0,6µL de H2O Milli-Q estéril. As reações de sequenciação ocorreram no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient nº5341), utilizando o seguinte programa: um período inicial de desnaturação de 3 minutos a 96°C, seguido de um ciclo de 25 repetições de 10 segundos a 96°C, 5 segundos à temperatura de *annealing* do respetivo *primer*, e 4 minutos a 60°C.

3.6.2. *Purificação dos produtos da reação de sequenciação e eletroforese capilar*

Após a reação de sequenciação purificaram-se os seus produtos de DNA obtidos através do BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems). Adicionou-se a cada poço da placa de sequenciação 45µL da solução SAM™, 10µL da solução XTerminator™ e 10µL do produto de PCR. Selou-se a placa de sequenciação

e agitou-se no vortex IKA® MS 3 Basic durante 30 minutos a 2000rpm, e posteriormente estas foram centrifugadas durante 2 minutos a 1000g.

Por fim, as amostras foram corridas no sequenciador automático Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems) para a realização da eletroforese capilar.

3.7. Análise dos dados

A detecção de polimorfismos envolve o conhecimento da sequência de DNA para um mesmo *loci* de vários indivíduos dentro de uma determinada população, permitindo a observação de posições específicas que possam apresentar variações as quais caracterizam os diferentes alelos. Desta forma, as sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa Codon Code Aligner versão 4.2.1. A qualidade das sequências obtidas foi verificada através do eletroferograma. Depois de verificada a qualidade, as sequências geradas foram alinhadas através do Clustal W para a detecção de SNPs.

IV. Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

A sensação de adstringência provocada pelo vinho é uma característica enológica muito importante. No entanto, a sua perceção entre os consumidores é muito distinta e variável, sugerindo a hipótese de haver, a ela associada, uma grande variabilidade genética.

Assim, torna-se importante esta análise da diversidade genética das PRPs. Tendo em conta que existem diferentes classes de PRPs, codificadas por famílias multigénicas (6 genes) muito semelhantes a nível estrutural, o objetivo deste projeto é estudar a variabilidade genética associada à perceção sensorial da adstringência dos vinhos. Como referido, aos genes PRP são já atribuídas cerca de 9600 alterações genéticas, sendo os SNPs as mais comuns. Deste modo, com este trabalho pretendeu-se implementar o protocolo para identificação de variações genéticas nestes genes, e testá-lo para uma população de 18 indivíduos.

4.1. Identificação e caracterização de genes PRPs

A identificação e caracterização de genes codificantes das PRPs foi a primeira tarefa realizada neste trabalho, e para tal utilizaram-se uma bateria de ferramentas bioinformáticas. Assim, estes genes foram identificados, selecionados e recolheu-se o máximo de informação sobre a família de genes PRPs. Nomeadamente, a identificação e caracterização dos genes PRPs e SNPs (se descritos) a fim de gerar uma base de dados auxiliar para a análise de resultados obtidos.

Como referido no capítulo Material e Métodos, foi realizada uma pesquisa bioinformática na base de dados *Ensembl* a fim de obter as sequências genéticas de cada um dos 6 genes PRP, e identificar e analisar de maneira aprofundada características como o tamanho, variabilidade proteica, SNPs e regulação dos genes PRPs descritos na literatura (Tabela.4).

Tabela 4 – Característica dos genes PRP: Tamanho em pares de bases dos genes e seus respectivos mRNA transcritos (adaptado da base de dados *Ensembl*).

Genes	Accession number	Tamanho (bp)	mRNA	Tamanho (bp)
<i>PRH1</i>	ENSG00000231887.2	3244	ENST00000428168	603
<i>PRH2</i>	ENSG00000134551.8	3105	ENST00000381847 ENST00000396400	673 641
<i>PRB1</i>	ENSG00000251655.2	43743	ENST00000500254 ENST00000545626 ENST00000546254 ENST00000240636	775 710 774 1773
<i>PRB2</i>	ENSG00000121335.10	109499	ENST00000389362 ENST00000565533 ENST00000545829	1427 100 406
<i>PRB3</i>	ENSG00000197870.7	3882	ENST00000381842 ENST00000538488 ENST00000279573 ENST00000440870 ENST00000539835	1091 1058 1157 618 476
<i>PRB4</i>	ENSG00000230657.2	3352	ENST00000535904 ENST00000445719 ENST00000279575	796 586 913

4.1.1. Pesquisa e caracterização de SNPs descritos

Como referido, através da pesquisa em bases de dados públicas, averiguou-se a existência de SNPs já descritos para os genes PRPs. Assim, verificou-se um grande número de SNPs descritos para cada um deles. Sendo um número demasiado grande, o conteúdo e caracterização total dos SNPs não será listado no presente trabalho, mas apenas a quantificação de SNPs por exão de cada um dos genes (Tabela.5). No entanto, segue-se o exemplo da figura 16 que demonstra o mapa de SNPs em zonas codificantes respetivo ao gene *PRH2*.

Tabela 5 – Quantificação de SNPs descritos por exão dos genes PRPs. Na tabela está representada o nome do gene, o exão e conteúdo em SNPs.

GENES	EXÃO	Nº SNPs
<i>PRH1</i>	1	1
	2	-
	3	9
	4	-
<i>PRH2</i>	1	3
	2	4
	3	17
	4	1
<i>PRB1</i>	1	1
	2	3
	3	3
	4	35
	5	2
<i>PRB2</i>	1	-
	2	5
	3	30
	4	3
<i>PRB3</i>	1	3
	2	2
	3	30
	4	10
	5	2
<i>PRB4</i>	1	6
	2	1
	3	72
	4	3

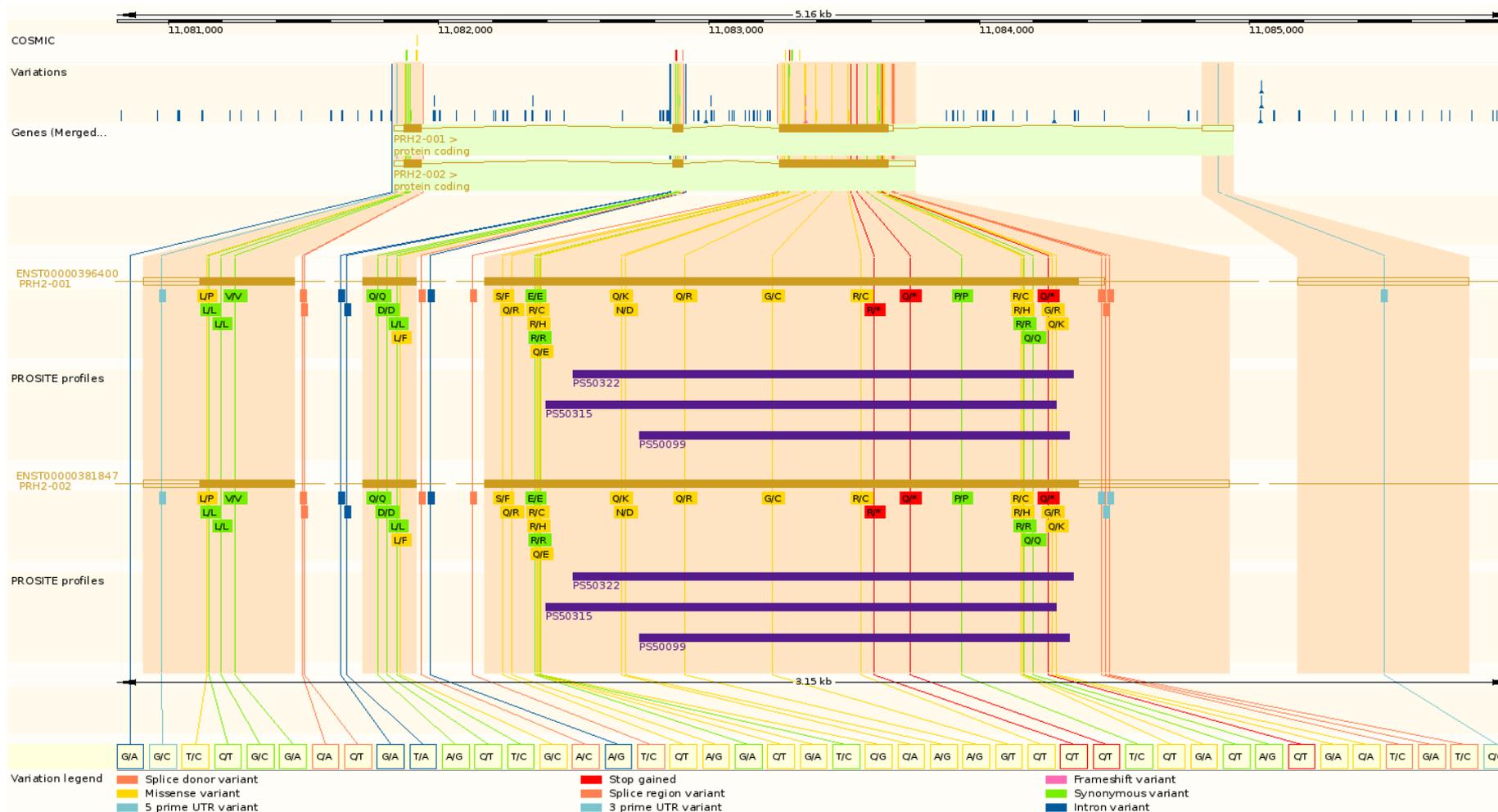


Figura 16 – Mapa de SNPs do gene *PRH2*. Nesta figura está representado o conteúdo e tipo de SNPs de ambos os transcritos do gene *PRH2* apenas em zonas de exões.

4.2. Desenho dos *primers*

Uma vez selecionadas as regiões genómicas com maior variabilidade genética, desenharam-se os *primers* (*forward e reverse*) de modo a implementar o protocolo para estudar a variabilidade genética dos genes codificantes das PRPs. Durante este processo, verificou-se uma elevada homologia entre os genes *PRB1* e *PRB2*, assim como entre o *PRH1* e o *PRH2*. Esta homologia veio impossibilitar o desenho de *primers* específicos para cada exão, motivo pelo qual foram excluídos da análise.

Deste modo, selecionaram-se os exões que apresentavam maior variabilidade descrita e, cumulativamente apresentavam menores taxas de homologias (Tabela.6).

Tabela 6 – Lista dos exões seleccionados para amplificação. Na tabela está representada o nome do gene, o exão, e conteúdo em SNPs.

Gene	Exão	Nº de SNPs descritos
<i>PRH2</i>	1	3
<i>PRH2</i>	3	17
<i>PRB3</i>	4	10
<i>PRB4</i>	3	72

Foram desenhados no total 8 *primers* (4 pares de *primers*) para a amplificação dos exões selecionados. Para o desenho dos *primers* foi utilizado as sequências dos genes *PRH2*, *PRB3* e *PRB4* como molde (adquirido no *software Ensembl*). Na tabela 7 encontra-se as sequências dos *primers* desenhados. Uma vez desenhados, a especificidade de cada um dos primers foi testada através de um BLAST contra o genoma humano.

Tabela 7 – Lista de *primers* utilizados para amplificar os exões acima selecionados. Na tabela está representada o nome do *primer* (F – *Forward*; R - *Reverse*), a sequência, a temperatura de *annealing* e o tamanho do amplicão.

Nome <i>primer</i>	<i>primer</i>	Ta (°C)	Amplicão (pb)
<i>PRH2E1_F</i>	TAGGCTAGAGTCCCAGAAGA	54	423
<i>PRH2E1_R</i>	GGTCTTGATGAGGAATGAAG		
<i>PRH2E3_F</i>	GACAGAGAGATATGAAGACAG	54	644
<i>PRH2E3_R</i>	CTTGCTACCTTATCCCAGAAT		
<i>PRB3E4_F</i>	AGCCAGAAGGACCACCTTCA	56	566
<i>PRB3E4_R</i>	TGGACCGAAAGCAGAGCAC		
<i>PRB4E3_F</i>	ATTTCCCCATTTAGCTCCA	53	787
<i>PRB4E3_R</i>	AACTGTAGCAATTAGAGTCC		

4.3. Amplificação dos exões

Neste estudo, recolheu-se amostras de saliva/células bucais de 18 indivíduos voluntários, cujo DNA foi extraído. Assim, a amplificação das 4 regiões genómicas selecionadas, com os *primers* desenhados, foi testada e otimizada. O processo de otimização e a amplificação, com sucesso, de cada uma destas regiões é descrito nas seguintes sub-seções:

4.3.1. Amplificação do Exão 1 do gene *PRH2*

Neste teste de amplificação pretendeu-se amplificar o primeiro exão do gene *PRH2* com o auxílio dos *primers* *PRH2E1* (*forward* e *reverse*) numa Ta = 54 °C. A figura seguinte demonstra o resultado da amplificação deste exão para cada uma das 18

amostras recolhidas. Analisando as bandas resultantes da eletroforese em gel, verifica-se que elas possuem o peso molecular aproximado do tamanho esperado do amplicão 423 bp (Fig.17), pelo que se considerou otimizada a reação.

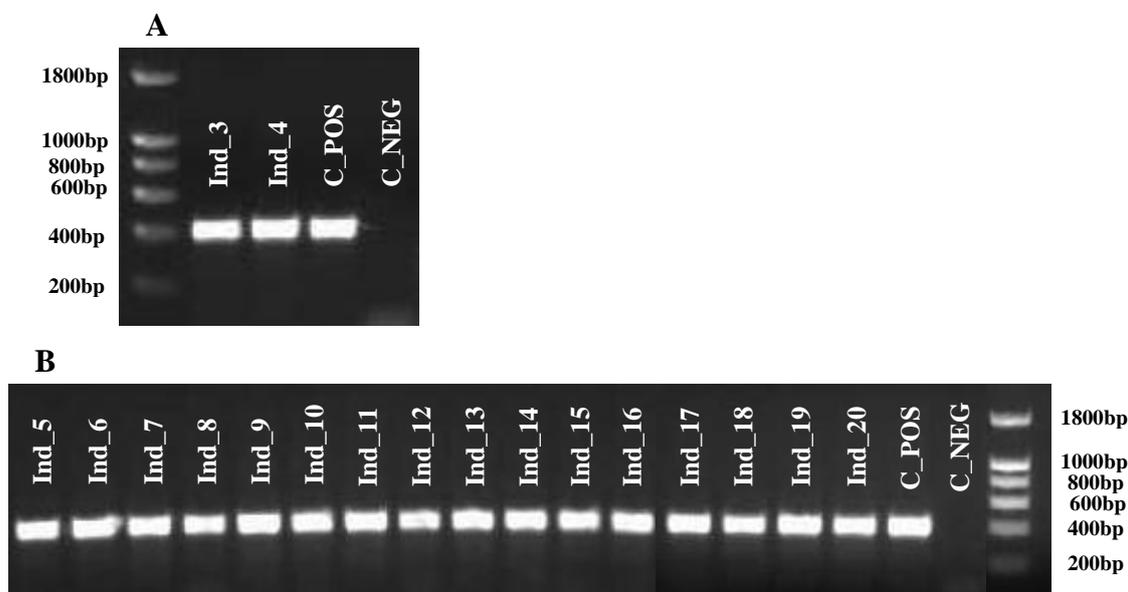


Figura 17 – Teste de amplificação aos *primers PRH2E1* em gel de agarose 1%. **A** – Teste de amplificação nas amostras Ind_3 e Ind_4. **B** – Teste de amplificação nas amostras Ind_5-20. Ao lado de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).

4.3.2. Amplificação do Exão 3 do gene *PRH2*

No sentido de testar o segundo par de *primers* para a região do exão 3 do gene *PRH2*, implementou-se o protocolo para a amplificação desta região. A temperatura de emparelhamento destes *primers* à cadeia de DNA também foi estimada a 54 °C e, à semelhança da amplificação do exão 1 do mesmo gene, verificou-se sucesso da amplificação para os *primers PRH2E3* (*foward* e *reverse*).

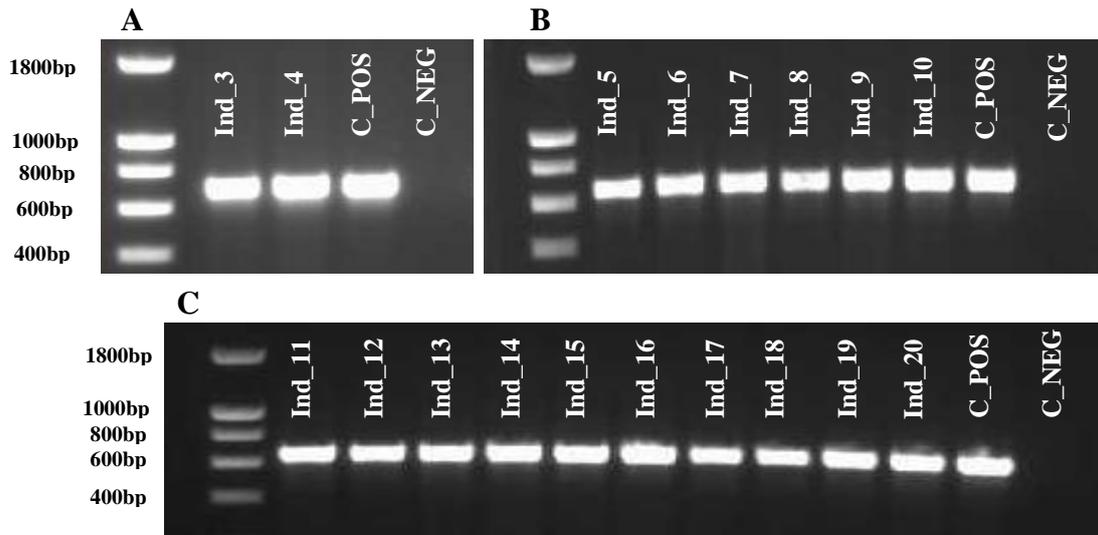


Figura 18 – Teste de amplificação aos *primers PRH2E3* em gel de agarose 1%. **A** – Teste de amplificação nas amostras Ind_3 e Ind_4. **B** – Teste de amplificação nas amostras Ind_5-10. **C** – Teste de amplificação nas amostras Ind_11- 20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).

Como se pode ver através da figura 18, detetou-se a forte presença das bandas nas 18 amostras, relativas à região alvo, apresentando o tamanho esperado do amplicão de 650 bp.

4.3.3. Amplificação do Exão 4 do gene *PRB3*

Mais uma vez, através da electroforese em gel de agarose (Fig.19), observa-se bom destaque das bandas perto dos 600 bp determinando a qualidade e sucesso deste teste para o par de *primers PRB3E4*. Pois, o tamanho das bandas coincide com o tamanho esperado (566 bp).

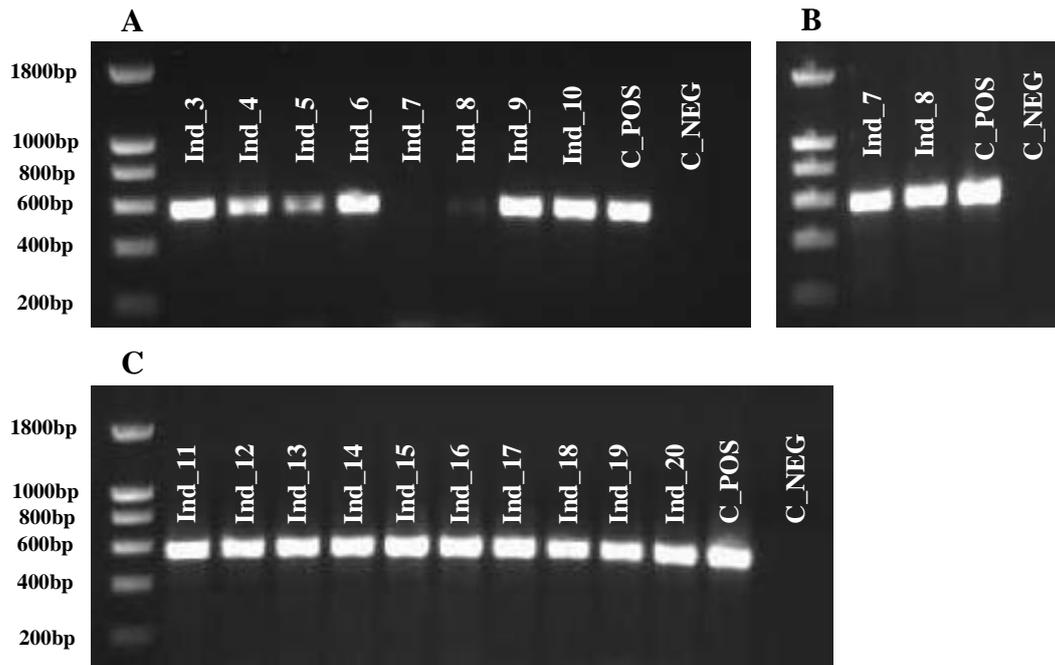


Figura 19 – Teste de amplificação aos *primers PRB3E4* em gel de agarose 1%. **A** – Teste de amplificação nas amostras Ind_3-10. **B** – Repetição do teste de amplificação das amostras Ind_7 e Ind_8. **C** – Teste de amplificação nas amostras Ind_11-20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).

No entanto, a região alvo dos *primers PRB3E4* para a amostra Ind_7 não amplificou e para a amostra Ind_8 resultou numa amplificação muito fraca (Fig.19A). Como tal, procedeu-se à repetição da reação de PCR das mesmas que, como se pode observar na figura 19B, amplificaram desta vez com sucesso.

4.3.4. Amplificação do Exão3 do gene *PRB4*

Como se pode observar na figura 20, o par de *primers PRB4E3* obteve uma fraca amplificação (bandas fracas) para as primeiras amostras testadas (Ind_3-10) o que levou à necessidade de realizar algumas otimizações para tornar mais eficiente este processo.

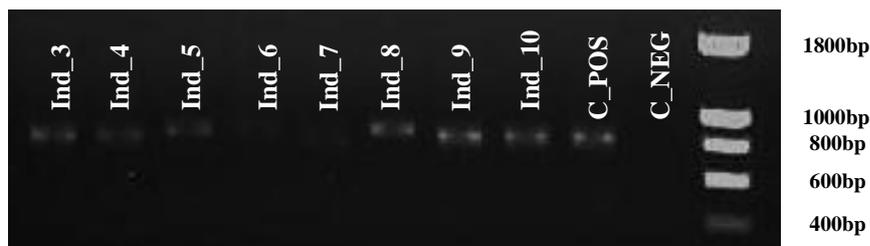


Figura 20 – Teste de amplificação aos *primers PRB4E3* em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizaram-se 8 amostras (Ind_3-10).

Assim, no sentido de aumentar a eficiência da amplificação do gene alvo, procedeu-se à otimização das reações de PCR para estes os pares de *primers*. Deste modo, diferentes temperaturas de *annealing* foram testadas, nomeadamente 51°C, 52°C e 53°C (Fig.21). Nesta otimização utilizou-se apenas o controlo positivo para evitar gastos de DNA das amostras. Os restantes parâmetros da reação de PCR mantiveram-se como está descrito na secção 3.3.2.

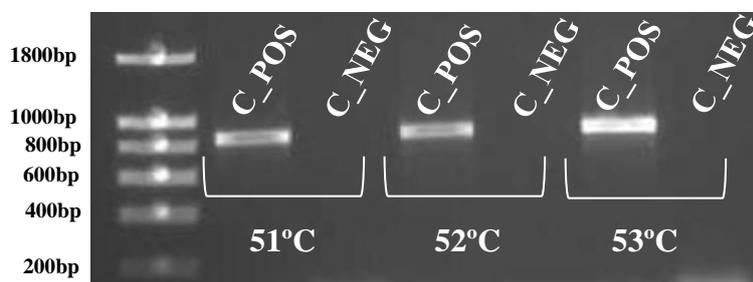


Figura 21 – Otimização dos pares de *primers PRB4E3* a diferentes temperaturas de *annealing* (T_a) - 51°C, 52°C e 53°C. Na extremidade encontra-se o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se o controlo positivo.

Neste teste, verificou-se uma boa amplificação do controlo positivo para dos pares de *primers PRB4E3* a 53°C através da presença de uma banda forte. Assim, procedeu-se à repetição da amplificação das amostras Ind_3-10 e à amplificação das restantes amostras Ind_11-20. Analisando os resultados da reação de PCR no gel de agarose e através da figura 22, embora algumas bandas não estejam idealmente fortes, verificou-se uma boa amplificação em geral para os pares de *primers* testados.

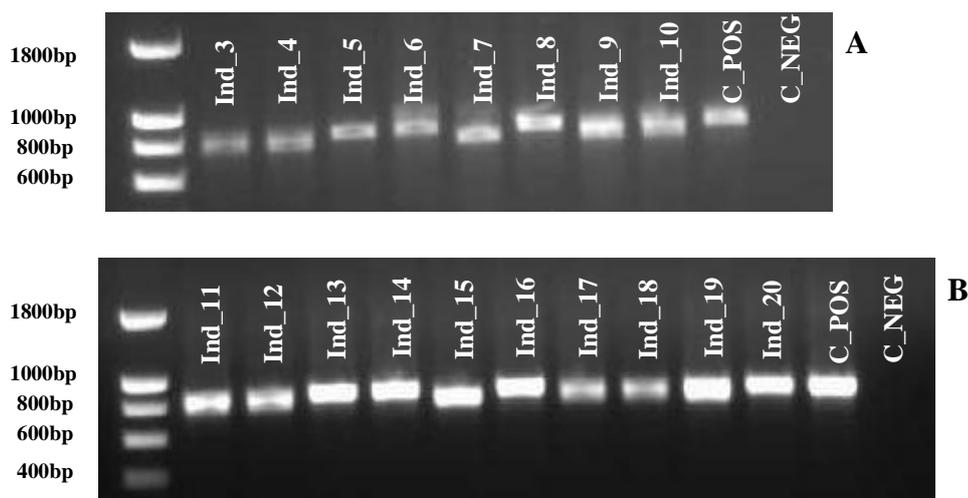


Figura 22 – Teste de amplificação aos *primers PRB4E3* em gel de agarose 1%. **A** – Teste de amplificação nas amostras Ind_3-10. **B** – Teste de amplificação nas amostras Ind_11-20. No lado esquerdo de cada imagem está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech).

4.4. Genotipagem dos genes codificantes das PRPs

Após otimizar as reações de amplificação, obtidos todos os produtos da reação das 4 regiões alvo para cada uma das amostras recolhidas, e após confirmação do sucesso e qualidade de cada uma destas amplificações através de eletroforese em gel de agarose, pode-se agora proceder a metodologia necessária para a genotipagem das amostras através do método de Sanger.

Durante a sequenciação, a fluorescência emitida por cada base é registada e por sua vez transformada num sinal. O conjunto destes sinais gera um gráfico conhecido como eletroferograma. O valor da qualidade da sequenciação para cada amostra é medido por um programa (Phred) que tem em conta vários parâmetros como: a distância entre bases; largura e altura do pico; intensidade do sinal; ruído de fundo (*background*) etc (Watson *et al.*, 2007).

Assim, numa primeira análise das seqüências obtidas, observou-se uma boa qualidade das amostras sequenciadas para os exões 1 e 3 do gene *PRH2*, e para o exão 4 do gene *PRB3*. Por outro lado, verificou-se um elevado *background* e fraco sinal das amostras Ind_4 e Ind_20 sequenciadas para a região do exão 3 do gene *PRB4*,

resultando na baixa qualidade destas. Este fato tornou inviável a leitura e análise destas duas sequências e poderá ter origem numa possível contaminação das amostras. Esta pode ser causada por vários acontecimentos, porém, segundo a análise dos picos no eletroferograma, as causas mais prováveis seriam a quantidade insuficiente de DNA, a amplificação inespecífica e/ou a presença de “restos” de *primers* não digeridos na reação de purificação. Por isso, e na impossibilidade de repetir a sequenciação, estas sequências foram retiradas da análise. Todas as restantes amostras sequenciadas para esta região apresentaram boa qualidade.

Após sequenciação e análise de qualidade, alinharam-se as sequências obtidas contra a base de dados anteriormente construída, e desta forma, detetaram-se os SNPs presentes na população teste (Fig.24).

Nas sequências obtidas, são utilizados os códigos degenerados, quando os indivíduos são heterozigóticos (ver tabela – Anexo).

Uma vez detetados, os SNPs foram de seguida confirmados por análise e comparação dos picos no eletroferograma. Isto é, na presença de um SNP, há deteção de dois picos diferentes na mesma posição. Por exemplo, no SNP rs116998526, detetado no eletroferograma apresentado na figura 23, observa-se um pico relativo à Guanina (G) na amostra Ind_13 e um pico relativo à Adenina (A) na amostra Ind_10 na mesma posição (região génica *PRH2*-Exão 3). Já a amostra Ind_15 possui os dois picos (Guanina e Adenina) sobrepostos o que sugere que este indivíduo é heterozigótico.

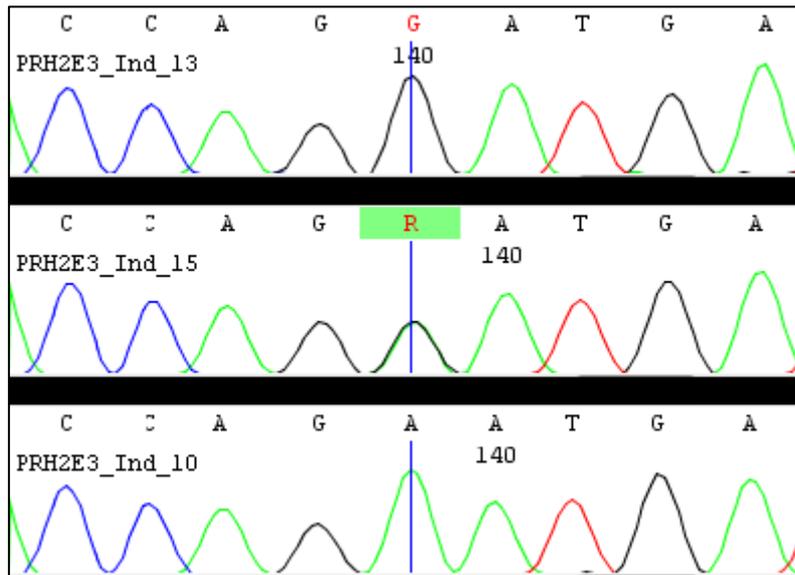


Figura 23 – Exemplo de um electroferograma obtido por genotipagem do SNP rs116998526 (caracterizado na tabela X) de três indivíduos diferentes: Ind_13, Ind_15 e Ind_10. Ind_13 é homozigótico para o alelo G, o Ind_10 é homozigótico para o alelo A e o Ind_15 C é heterozigótico.

Analisando os resultados obtidos, foram detetados um total de 22 SNPs. Deste total, 2 SNPs pertencem à região génica *PRH2* Exão 3 e os restantes 20 SNPs pertencem à região génica *PRB4* Exão 3. Relativamente às amostras sequenciadas para as regiões do Exão 1 e Exão 4 dos genes *PRH2* e *PRB3* respetivamente, não revelaram a existência de SNPs. Sendo estas as regiões que apresentam menor variabilidade descrita, entre as selecionadas, estes resultados revelam-se concordantes com o esperado.

A caracterização dos SNPs é essencial para a análise do seu potencial efeito nestas regiões génicas. Assim, procurou-se averiguar o tipo de cada um deles, o alelo alterado, o aminoácido que codifica, e a percentagem da frequência dos alelos nas amostras. A listagem e caracterização dos SNPs obtidos estão representadas na tabela 8.

SNPs descritos_PRH2E3	..R.....R.....H.....Y.....Y.....												
PRH2E3_Ind_3Y.....												
PRH2E3_Ind_4												
PRH2E3_Ind_6												
PRH2E3_Ind_16												
PRH2E3_Ind_19Y.....												
PRH2E3_Ind_20												
PRH2E3_Ind_5												
PRH2E3_Ind_11												
PRH2E3_Ind_14												
PRH2E3_Ind_18												
PRH2E3_Ind_7Y.....												
PRH2E3_Ind_9T.....												
PRH2E3_Ind_12Y.....												
PRH2E3_Ind_8												
PRH2E3_Ind_13												
PRH2E3_Ind_15Y.....												
PRH2E3_Ind_10Y.....												
PRH2E3_Ind_17												
Contig5:	CCGCCACAAAGGACCTCCACAGGGGCAGTCTCCTCAGTAATCTAGGATTCAATGACAGGTATGATTCCAGTTTATTATCCATCAAAGGCTCCAAGTCTACAGTTCTCCAACCTCATTGTGCCAGTG												
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530

Figura 24 - Sequências alinhadas para a região do exão 3 do gene *PRH2*. A primeira sequência corresponde à sequência contendo todos os SNPs descritos nesta região. Os pontos (.) correspondem a zonas conservadas. Na posição 464 encontra-se o SNP rs10772391 (ver tabela 8).

Tabela 8 – Listagem, correspondência e caracterização dos SNPs encontrados nas sequências obtidas através do método de Sanger.

Gene_Exão	SNP	Código degenerado	Tipo	Alelo	Aminoácido	% Alelos Individuos		
18 amostras								
Gene PRH2 _Exão3	rs116998526	R	"Missense"	AAT/GAT	Asn/Asp	66,6% A	5,6% G	27,8% R
	rs10772391	Y	Região de <i>splicing</i> /3'UTR	C/T	Codão não codificante	61,1% C	5,6% T	33,3% Y
16 amostras								
Gene PRB4 _Exão3	rs76859544	S	"Missense"	CAA/GAA	Gln/Glu	62,5% C	37,5% G	0% S
	rs79562958	S	"Missense"	CCA/CGA	Pro/Arg	62,5% C	0% G	37,5% S
	rs78020621	M	Silencioso	GGA/GGC	Gly	62,5% A	37,5% C	0% M
	rs79639556	M	"Missense"	CCT/CAT	Pro/His	0% A	62,5% C	37,5% M
	rs77184113	R	"Missense"	GGA/AGA	Gly/Arg	50% G	37,5% A	12,5% R
	rs75743553	V	"Missense"	CGA/CCA/CAA	Arg/Pro/Gln	37,5% C	25% G	0% A 37,5% S
	rs57934872	M	Silencioso	GGC/GGA	Gly	62,5% C	37,5% A	0% M
	rs76148790	M	"Missense"	CCC/ACC	Pro/Thr	62,5% C	6,25% A	31,25% M
	rs78434062	M	"Missense"	CAT/CCT	His/Pro	37,5% C	62,5% A	0% M
	rs74855306	R	"Missense"	AGA/GGA	Arg/Gly	37,5% G	62,5% A	0% R
	rs56350547	S	"Missense"	CCA/CGA	Pro/Arg	0% G	62,5% C	37,5% S
	rs59021567	M	Silencioso	GGA/GGC	Gly	37,5% C	62,5% A	0% M
	rs12303607	M	"Missense"	ACC/CCC	Thr/Pro	37,5% C	62,5% A	0% M
	rs59189129	M	"Missense"	CCT/CAT	Pro/His	37,5% A	62,5% C	0% M
	rs11054244	R	"Missense"	AGA/GGA	Arg/Gly	50% A	0% G	50% R
	rs12369220	M	"Missense"	CAC/CAA	His/Gln	0% C	0% A	100% M
	rs12369219	S	"Missense"	CGT/GGT	Arg/Gly	50% C	0% G	50% S
	rs1052807	H	Silencioso	GGT/GGA/GGC	Gly	37,5% C	0% A	37,5% T 25% Y
rs59763528	S	"Missense"	GGT/CGT	Gly/Arg	50% G	0% C	50% S	
rs59774427	M	"Missense"	CAT/CCT	His/Pro	6,25% C	6,25% A	87,5% M	

Após análise de todos os dados, verificou-se que todos os SNPs detetados estão descritos na base de dados. Além disso, verificaram-se vários tipos de SNPs, dentro dos mais comuns os tipos missense e silencioso (Fig.25). Um SNP é missense quando ocorre alteração de um único par de bases levando à tradução de um aminoácido diferente nessa mesma posição da proteína resultante. Por exemplo, o primeiro SNP detetado na região génica *PRB4* Exão 3 (SNP rs76859544) resulta da substituição do alelo C pelo alelo G. Este fenómeno leva à alteração do codão CAA, codificante do aminoácido Glutamina, para um novo codão GAA que codifica o aminoácido Glutamato. Esta alteração de aminoácido pode alterar a estrutura e/ou função da proteína, torná-la não funcional ou não apresentar qualquer efeito nesta. Já o tipo silencioso, aquando a ocorrência de um SNP, não apresenta qualquer efeito para a proteína resultante. Pois, devido à redundância do código genético, este não conduz à alteração do aminoácido.

Também se verificou que o SNP-rs10772391 se encontra simultaneamente nas regiões de *splicing* e 3' UTR (untranslated regions) do exão 3 do gene *PRH2*. Este SNP insere-se noutros tipos de polimorfismos, pois está localizado em regiões não traduzida do mRNA. Deste modo, a presença de SNPs em regiões de *splicing* podem resultar na inserção, exclusão ou modificação dos tamanhos dos exões para posterior tradução, e ainda podem alterar a estabilidade do mRNA e/ou da proteína. Por outro lado, SNPs em regiões 3' UTR (importantes regiões reguladoras) podem ter impacto na regulação da expressão génica.

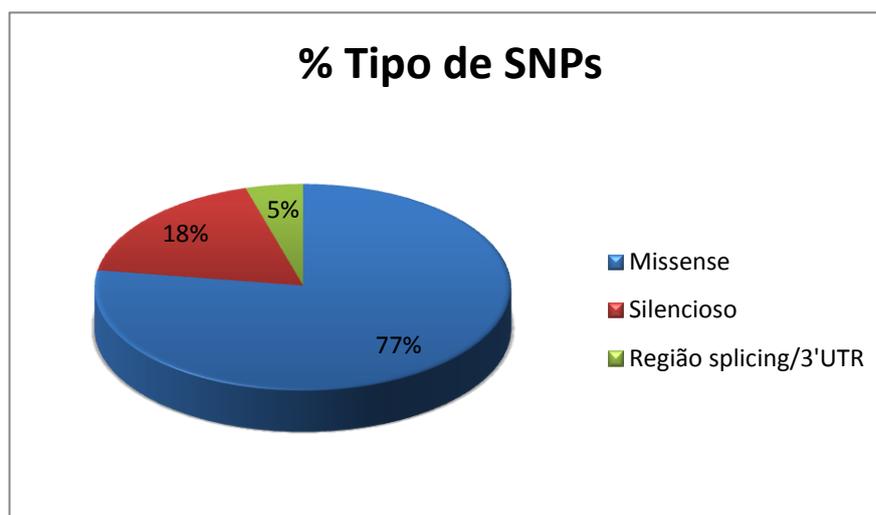


Figura 25 – Representação gráfica da frequência (em percentagem) dos diferentes tipos de SNPs encontrados nas amostras.

Com o intuito de descrever a diversidade genética ao nível da população, calculou-se a frequência alélica de cada um dos SNPs na população teste (tabela.8). Exemplificando, o SNP rs116998526 presente na região génica *PRH2*-Exão 3 (18 amostras), foi detetado 11 indivíduos apresentando o alelo A, 1 indivíduo apresentando o alelo G e 6 indivíduos heterozigóticos. Deste modo, o alelo A representa 66,6% da população, o alelo G, por sua vez, representa 5,6% e a heterozigotia representa 27,8%. À semelhança deste efectuou-se o mesmo processo para todos os SNPs detetados. Analisando agora um SNP-rs78434062 localizado na região génica *PRB4* Exão 3, 37,5% dos 16 indivíduos possuem uma histidina enquanto 62,5% dos restantes possuem uma prolina nesta mesma posição. Isto significa que, se se compararem as proteínas resultantes do gene *PRB4* destes indivíduos, estas apresentariam pelo menos um aminoácido diferente nesta posição.

De todos os SNPs detetados, 77% apresentam o tipo missense (Fig.25). Isto é, 77% dos SNPs levam à tradução de um aminoácido diferente e conseqüentemente a proteínas diferentes no seu conteúdo em aminoácidos. Sabendo que este fenómeno acontece para os restantes 19 SNPs detetados, estes resultados revelam grande variabilidade genética.

Tabela 9 – Comparação da frequência alélica da população em estudo com a frequência alélica descrita na Europa e no Mundo (*Ensembl, 2013*).

SNPs	Frequência Alélica Amostras		Frequência alélica Europa		Frequência alélica Mundo	
Exão 3 <i>PRH2</i>	18 amostras		1000 Genomas			
rs116998526	66,6% A	5,6% G	72% A	28% G	76% A	24% G
rs10772391	61,1% C	5,6% T	86% C	14% T	79% C	21% T
Exão 3 <i>PRB4</i>	16 amostras		1000 Genomas			
rs12303607	37,5% C	62,5% A	21% C	79% A	25% C	75% A
rs59189129	37,5% A	62,5% C	28% A	72% C	29% A	71% C
rs11054244	50% A	0% G	84% A	16% G	82% A	18% G
rs1052807	37,5% C	37,5% T	18% T	82% C	26% T	74% C

Para além destes dados, procurou-se também comparar estes valores à sua frequência alélica a nível Europeu e Mundial para 1000 genomas. Porém, estas informações estavam descritas apenas para 6 SNPs detetados (Tabela.9). Assim, de maneira geral, a comparação da taxa de variabilidade da população teste corresponde aos valores esperados. Numa primeira análise, a comparação entre as frequências alélicas da população a nível europeu e da população a nível mundial para 1000 amostras, são efetivamente muito semelhantes sendo a diferença máxima de 8% (SNP rs1052807). É também importante notar que a base de dados não apresentava a frequência para indivíduos heterozigóticos. Assim, comparando estes valores com os valores da população teste, verifica-se que os SNPs rs116998526, rs10772391, rs12303607 e rs59189129 apresentam valores semelhantes ao esperado. Já para o SNP rs11054244, não se verificou a presença do alelo G, contudo também se observou uma baixa frequência deste alelo a nível europeu de apenas 16%. Relativamente ao SNP rs1052807, na população teste detetou-se a mesma percentagem para ambos os alelos correspondentes. Enquanto estes, a nível europeu e mundial, apresentam frequências bastante distintas: 18% para o alelo T e 82% para o alelo C, 26% para o alelo T e 74% para o alelo C, respetivamente.

V. Conclusão

5. Conclusão

Os taninos têm uma particular importância em enologia visto estarem diretamente relacionados quer com a qualidade dos vinhos quer com as sensações gustativas que produzem. De fato, aquando a degustação do vinho, estes compostos fenólicos são capazes de interagir e formar complexos preferencialmente com as proteínas salivares PRP que, ao precipitarem, conduzem à sensação de adstringência. Estas proteínas têm sido bastante estudadas por vários investigadores estando disponível um conjunto apreciável de informação sobre as suas diferentes classes, estruturas, isoformas, características (grau de afinidade com taninos), e genética.

De modo a perceber a probabilidade dos SNPs dos genes PRPS alterarem a perceção da adstringência, neste estudo foram utilizados métodos tradicionais de sequenciação de DNA dos genes codificantes das PRPs numa população humana composta por 18 indivíduos.

Com base nos resultados obtidos, foi detetada variabilidade no exão 3 dos genes *PRH2* e *PRB4*. No primeiro foram detetados 2 SNPs e no segundo 20 SNPs, todos descritos na literatura. De acordo com a informação disponível na base de dados, estes exões apresentam maior variabilidade descrita (17 e 72 SNPs descritos, respetivamente) quando comparados com os restantes exões selecionados. Deste modo, estes resultados estão concordantes com o esperado tendo em conta o número preliminar de indivíduos estudados.

Também neste estudo, foi avaliado e caracterizado o tipo de SNP detetado. Assim, verificou-se que 77% dos SNPs detetados na população pertenciam ao tipo missense. Isto é, 77% dos SNPs levam à tradução de um aminoácido diferente e consequentemente a proteínas diferentes no seu conteúdo em aminoácidos. Este fato é de grande importância visto que estas diferenças no conteúdo em aminoácidos pode alterar a estrutura e/ou função da proteína, torná-la não funcional. No entanto, também pode não apresentar qualquer efeito nesta. Para averiguar estes possíveis fenótipos seria necessário efetuar outros estudos mais aprofundados e a nível proteico. De qualquer forma, os resultados obtidos aumentam a probabilidade destas diferenças nas proteínas resultarem na alteração da interação das PRPs com os taninos dos vinhos e consequentemente na modulação da sensação de adstringência.

No seguimento deste trabalho, também foram comparadas as frequências alélicas de alguns SNPs da população teste (16 a 18 indivíduos) com as frequências a nível europeu e mundial (1000 genomas), disponíveis na base de dados. Os resultados da população teste, de maneira geral, foram concordantes com os resultados a nível europeu e mundial sugerindo um possível padrão para determinados fenótipos.

Como trabalho futuro, sugere-se um estudo no sentido de investigar os fenótipos associados aos SNPs ou um estudo semelhante mais aprofundado no sentido de averiguar a diversidade genética das PRPs para uma população mais significativa (50-100 indivíduos).

VI. Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- Andersen, M., e Jordheim, M. 2010. Anthocyanins. *Encyclopedia of life sciences*: 10, 1-12.
- Arnold, R. A., e Noble, A. C. 1978. Bitterness and astringency of grape seed phenolics in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*: 29, 150-152.
- Arnold, R. A., Noble, A. C., e Singleton, V. L. 1980. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 28, 675-678.
- Asano, K., Shinagawa, K., e Hashimoto, N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *American Society of Brewing Chemists Journal*: 40 (4), 147-154.
- Asikyan, M. L. 2005. Use of SDS-PAGE for determining salivary protein composition and application to astringency perception elicited by red wine. *BSc (Hon) Thesis*, Brock University, St. Catharines, ON.
- ASTM. 2004. Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2004.
- Azen, E. A. 1993. Genetics of Salivary Protein Polymorphisms. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*: 4, 479-485.
- Bacon, J. R., e Rhodes, M. J. C. 1998. Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46 (12), 5083-5088.
- Bakker, J. 1998. Astringency: A matter of taste. *Biologist*: 45, 104-107.
- Bate-Smith, E. C. 1954. Astringency in foods. *Food*: 23, 124-127.
- Bate-Smith, E. C. (1973). Haem analysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochem*: 12, 907-912.

- Baxter, N. F., Lilley, T. H., Haslam, E., e Williamson, M. P. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat results in complexation and precipitation. *Biochemistry*: 36, 5566-5577.
- Bennick, A. 2002. Interaction of Plant Polyphenols with Salivary Proteins. *Critical Review in Oral Biology and Medicine*: 13, 184-196.
- Blytt, H. J., Guscar, T. K., e Butler, L. G. 1988. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *Journal of Chemical Ecology*: 14, 1455-1465.
- Breslin, P. A. S., Gilmore, M. M., Beauchamp, G. K., e Green, B. G. 1993. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses*: 18, 405-417.
- Cabrita, M. J., Da Silva, J. R., e Laureano, O. 2003. Os compostos fenólicos das uvas e dos vinhos. I Seminário Internacional de Viticultura: Universidade Técnica de Lisboa.
- Carlson, D. M. 1993. Salivary Proline-Rich Proteins: Biochemistry, Molecular Biology, and Regulation of Expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*: 4, 495-502.
- Carvalho, E. B. 2007. Estudos da Interação entre Proteínas e Taninos: Influência da presença de polissacarídeos. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Tese de Doutoramento.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., e Williamson, M. P. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 50 (6), 1593-1601.
- Chung-Maccoubrey, A. L., Hagerman, A. E., e Kirkpatrick, R. L. 1997. Effect of tannins on digestion and detoxification activity in gray squirrels (*Sciurus carolinensis*). *Physiological Zoology*: 70, 270-277.
- Clifford, M. N. 1997. Astringency. *Phytochemistry of Fruits and Vegetables: proceedings of the phytochemical society of Europe*. Tomás-Barberán, F. A., e Robins, R. J., Oxford University Press.

- Condelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E., e Bertuccioli, M. 2005, Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference*: 17, 96-107.
- Corrigan, C. J., e Lawless, H.T., 1995. Astringent subqualities in acids. *Chemical Senses*: 20, 593-600.
- de Freitas, V., e Mateus, N., 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 49 (2), 940-945.
- Dearing, M. D., Foley, W. J., e McLean, S. 2005. The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*: 36, 169-189.
- Del Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., e Zamora, F. 2008: Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology*: 226, 337-344
- Di Stefano, R. 1996. Chemical methods in varietal characterization. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*: 1, 51-56.
- Edelmann, A., e Lendl, B. 2002. Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin- protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*: 124 (49), 14741-14747.
- Fábián, T. K., Hermann, P., Beck, A., Fejérdy, P., e Fábián, G. 2012. Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. *International Journal of Molecular Science*: 13, 4295-4320.
- Fischer, U., Boulton, R. B., e Noble, A. C. 1994. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality & Preference*: 5:55-64.
- Fitzgerald, M., e Shenk, T. 1981. The sequence 5'-AAUAAA-3' forms parts of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell*: 24, 251-260

- Fowler, M. E. e Richards, W. P. C. 1965. Acorn poisoning in a cow and a sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*: 147, 1215-1220.
- Francis, F.J. 2000. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*: 45, 208-213.
- Hagerman, A. E., e Butler, L. G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 26, 809-812.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Pessina, R., e Moio, L. 2006. Evaluation of aglianico rape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. *Food Chemistry*: 97 (4), 614-620.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*: 4, 74-95.
- Gawel, R., Oberholster, A., e Francis, I. L. 2000. A mouth-feel wheel: terminology for communicating the mouth-feel properties of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*: 6, 203-207.
- Hagerman, A. E., e Butler, L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*: 256, 4494-4497.
- Hagerman, A. E., e Robbins, C. T., 1987. Implications of soluble tannin protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemical Ecology*: 13, 1243-1259.
- Hagerman, A. E., Rice, M. E., e Ritchard, N. T. 1998. Mechanisms of protein precipitation of two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16(4-8) catechin (procyanin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46, 2590-2595.
- Hartwig, P., e McDaniel, M. R. 1995. Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels. *Journal of Food Science*: 60, 384-388.
- Haslam, E., Lilley, T. H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., *et al.* 1991. Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. In: Phenolic compounds in food and their effects on health. I. Analysis, occurrence and chemistry. Ho, C-T., Lee, C. Y., Huang, M-T. (editors). Washington, DC: *American Chemical Society*: 506, 8-49.

- Hay, D. I., Bennick, A., Schlesinger, D. H., Minaguchi, K. *et al.* 1988. The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f). *Biochemical Journal*: 255, 15-21.
- Horne, J., Hayes, J., e Lawless, H. T. 2002. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemical Senses*: 27 (7), 653-659.
- Inzitari, R., Cabras, T., Onnis, G., Olmi, C., Mastinu, A., Sanna, M. T., Pellegrini, M. G., Castagnola, M., e Messana, I. 2005. Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins. *Proteomics*: 5, 805-815.
- Ishikawa, T. e Noble, A. C. 1995. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality & Preference*: 6, 27-33.
- Jenzano, J. W., Hogan, S. L., Noyes, C. M., Featherstone, G. L., e Lundblad, R. L. 1986. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. *Analytical Biochemistry*: 159, 370-376.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P., e Williamson, M. P. 2004. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*: 52, 942-949.
- Jones, W. T., e Mangan, J.L. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 28, 126-136.
- Joslyn, M. A., e Goldstein, J. L. 1964. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Advances in Food Research*: 13, 179-217.
- Kallithraka, S., Bakker, J., e Clifford, M. N. 1998. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies*: 13 (1), 29-43.
- Kallithraka, S., Bakker, J., e Clifford, M. N. 2001. Interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 81 (2), 261-268.
- Kawamoto, H., e Nakatsubo, F. 1997. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*: 46, 479-483.

- Kawamoto, H., Nakatsubo, F., e Murakami, K. 1995. Quantitative determination of tannin and protein in the precipitates by high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry*: 40, 1503-1505.
- Kennedy, J. A. 2008. Grape and Wine Phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigación Agraria*: 35(2), 107-120.
- Kim, H. S., e Maeda, N. 1986. Structure of two *HaeIII*-type genes in the human salivary proline-rich protein multigene family. *Journal of Biological Chemistry*: 261, 6712-6718.
- Kim, H. S., Lyons, K. M., Saitoh, E., Azen, E. A., Smithies, O., e Maeda, N. 1993. The structure and evolution of the human salivary proline-rich protein gene family. *Mammalian Genome*: 4, 3-14.
- Lawless, H. T., Corrigan, C. J., e Lee, C. B. 1994. Interactions of Astringent Substances. *Chemical Senses*: 19 (2), 141-154.
- Lea, A. G. H., e Arnold, G. M. 1978. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 29, 478-483.
- Lee, C. B., e Lawless, H. T. 1991. Time-Course Of Astringent Sensations. *Chemical Senses*: 16 (3), 225-238.
- Lesschaeve, I., e Noble, A. C. 2005. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*: 81(1), 330S-335S.
- Lu, Y., e Bennick, A., 1998. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*: 43, 717-728.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Lilley, T. H., e Haslam, E. 1994. Polyphenols, Astringency and Proline-Rich Proteins. *Phytochemistry*: 37 (2), 357-371.
- Lyman, B. J., e Green, B. G. 1990. Oral astringency: effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chemical Senses*: 15, 151-164.

- Lyons, K. M., Azen, E. A., Goodman, P. A., e Smithies, O. 1988. Many protein products from a few loci: assignment of human salivary proline-rich proteins to specific loci. *Genetics*: 120, 255-265.
- Maeda, N. 1985. Inheritance of human salivary proline-rich proteins: a reinterpretation in terms of six loci forming two subfamilies. *Biochemical Genetics*: 23,455-464.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., e Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*: 79 (5), 727-747.
- McArthur, C., Hagerman, A., e Robbins, C. T. 1991. Physiological strategies of mammalian herbivores against plant defences. Palo, R. T., e Robbins, C. T. (editors). CRC Press, Florida: *Plant Defences Against Mammalian Herbivory*: 103-114.
- McRae, J. M., e Kennedy, J. A. 2011. Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and their impact on Astringency: A Review of Current Research. *Molecules*: 16, 2348-2364.
- Messana, I., Cabras, T., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, C., Fadda, M. B., Cordaro, M., Giardina, B., e Castagnola, M. 2004. Characterization of the Human Salivary Basic Proline-Rich Protein Complex by a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research*: 3, 792-800.
- Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C., e Bertuccioli, M. 2004. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*: 15, 761-769.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., e Parajo, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*: 72 (2), 145-171.
- Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., e Haslam, E. 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*: 219, 923-935.

- Naczka, M., e Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: 41 (5), 1523-1542.
- Noble, A. C. 1990. Bitterness and astringency in wine. Rouseff, R. L. (Editor). In: 'Bitterness in Foods and Beverages' Amsterdam: *Elsevier Science*: 145-158.
- Oh, H. II., Hoff, J. E., Armstrong, G. S., e Haff, L. A. 1980. Hydrophobic interactions in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 28, 394-398.
- Ozawa, T., Lilley, T. H., e Haslam, E. 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*: 26, 2937-2942.
- Papadopoulou, A., e Frazier, R. A. 2004. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*: 15 (3-4), 186-190.
- Peleg, H., e Noble, A. C. 1999. Effect of viscosity, temperature and pH on astringency in cranberry juice. *Food Quality & Preference*: 100, 343-347.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., e Noble, A. 1999. Bitterness and astringency of flavon-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 79, 1123-1128.
- Pickering, G. J., Bajec, M. R. 2008. Astringency: Mechanisms and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 48, 858-875
- Ramasubbu, N., Thomas, L. M., Bhandary, K. K., e Levine, M. J. 1993. Structural Characteristics of Human Salivary Statherin: A Model for Boundary Lubrication at the Enamel Surface. *Critical reviews in Oral Biology and Medicine*: 4, 363-370.
- Robbins, C. T., Hanley, T. A., Hagerman, A. E., Hjeljord, O., Baker, D. L., Schwartz, C. C., e Mautz, W. W. 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology*: 68, 98-107.
- Romeyer, F. M., Sapis, J. C., e Macheix, J. J. 1985. Hidroxicinnamic esters and browning potencial in mature berries of some grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 36, 728-732

- Rubico, S. M., e McDaniel, M. R. 1992. Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses*: 17, 273-289.
- Sanger, F., Nicklen, S., e Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 74(12), 5463-5467.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., e Moutounet, M. 1999. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 47 (1), 42-47.
- Scalbert, A., e Williamson, G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*: 130, 2073S-2085S.
- Shahidi, F., e Naczk, M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Effects: CRC Press, Boca Raton, FL.
- Shimada, T. 2006. Salivary Proteins as a Defense Against Dietary Tannins. *Journal of Chemical Ecology*: 32, 1149-1163.
- Shimada, T., e Saitoh, T. 2003. Negative effects of acorns on the wood mouse *Apodemus speciosus*. *Population Ecology*: 45, 7-17.
- Siebert, K. J. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, Stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 47 (2), 353-362.
- Simon, S., Hall, W. L., e Schiffman, S. S. 1992. Astringent-tasting compounds alter ion transport across isolated canine lingual epithelia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*: 43, 271-283.
- Smith, A. K., June, H., e Noble, A. C. 1996. Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Quality & Preference*: 7(3/4), 161- 166.
- Soares, S., Vitorino, R., Osório, H., Fernandes, A., Venâncio, A., Mateus, N., Amado, F., e Freitas, V. 2011. Reactivity of Human Salivary Proteins Families Toward Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 59, 5535-5547.

- Sowalski, R. A., e Noble, A. C. 1998. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses*: 23, 343-349.
- Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H., e Haslam, E. 1988. Polyphenol complexation: Some thoughts and observations. *Phytochemistry*: 27, 2397-2409.
- Van der Reijden, W. A., Van der Kwaak, H., Vissink, A., Veerman, E. C. I., e Nieuw Amerongen, A. V. 1996. Treatment of Xerostomia with polymer based saliva substitutes in patients with Sjogren's Syndrome. *Arthritis and Rheumatism*: 39, 57-63.
- Viccari, N. F., Soccol, M. C., e Ide, G. M. 2009. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. *Revista de Ciências Agroveterinárias*: 8, 71-83.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., e Waters, E. J. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a winelike medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 83, 564-573.
- Waterhouse, A. L. 2002. Wine Phenolics. *Annals New York Academy of Sciences*: 957, 21-36.
- Watson, J. D. 2007. Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course. Freeman W.H. (editor). San Francisco: *International Standard Book Number*: 0-7167-2866-4.
- Whitelegge, J. P., Zabrouskov, V., Halgand, F., Souda, P., Bassilian, S., Yan, W., Wolinsky, L., Loo, J. A., Wong, D. T. W., Faull, K. F. 2007. Protein-sequence polymorphisms and post-translational modifications in proteins from human saliva using top-down Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*: 268, 190-197.
- Xie, H., Rhodus, N. L., Griffin, R. J., Carlis, J. V., e Griffin, T. J. 2005. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*: 4, 1826- 1830.

Yamada, N., Yuji, R., Suzuki, E. 2009. The Current Status and Future Prospects of the Salivary Proteome. *Journal of Health Science*: 55, 682-688.

Yan, Q. Y., e Bennick, A 1995. Identification Of Histatins As Tannin-Binding Proteins In Human Saliva. *Biochemical Journal*: 311, 341-347.

Yokotsuka, K. e Singleton, V. R. 1987. Interactive precipitation between graded peptides from gelatin and specific grape tannin fractions in wine-like model solutions. *American Journal of Enology and Viticulture*: 38, 199-206.

Yokotsuka, K. e Singleton, V. L. 1995. Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: Turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*: 46, 329-338.

<http://www.ensembl.org/index.html>: acedido a 20/10/2012.

Anexo

Anexo I

Tabela 1 – Código degenerado (adaptado, Cornish-Bowden, 1985).

Código IUPAC	Significado	Complemento
A	A	T
C	C	G
G	G	C
T/U	T	A
M	A ou C	K
R	A ou G	Y
S	C ou G	S
Y	C ou T	R
V	A ou C ou G	B
H	A ou C ou T	D