

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2017.04.28**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2018.11.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2023.02.22**
41/2023

(73) Titular(es):

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

LARGO DOS COLEGIAIS, 2 7000-803 ÉVORA PT

(72) Inventor(es):

ELSA CRISTINA CARONA DE SOUSA LAMY

PT

LÉNIA ISABEL ALFAIATE RODRIGUES

PT

CRISTINA MARIA DOS SANTOS CONCEIÇÃO PINHEIRO

PT

(74) Mandatário:

MARIA PEREIRA DA CRUZ ALVES GARCIA

AV. CASAL RIBEIRO, 50, 3º ANDAR 1000-093 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA DETERMINAR A SENSIBILIDADE GUSTATIVA BASEADO EM MARCADORES BIOQUÍMICOS SALIVARES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE GUSTATIVA, NOMEADAMENTE PARA O GOSTO AMARGO E PARA O GOSTO DOCE, DE UM SUJEITO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SALIVARES ESPECÍFICAS. O REFERIDO MÉTODO COMPREENDE A COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SALIVARES MARCADORAS, DE UMA AMOSTRA DE SALIVA A TESTAR, COM AS DE UMA AMOSTRA DE SALIVA PADRÃO, I.E., COM NÍVEIS DE PROTEÍNAS SALIVARES CONHECIDOS, PARA O GOSTO AMARGO E PARA O GOSTO DOCE. A PRESENTE INVENÇÃO TEM APLICAÇÃO NO SETOR AGROALIMENTAR E NA ÁREA DA SAÚDE, ENCONTRANDO-SE NO DOMÍNIO TÉCNICO DA BIOQUÍMICA E DE EQUIPAMENTOS DE MEDIÇÃO BIOQUÍMICOS.

RESUMO

MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE GUSTATIVA BASEADA EM MARCADORES BIOQUÍMICOS SALIVARES

A presente invenção refere-se a um método para determinação da sensibilidade gustativa, nomeadamente para o gosto amargo e para o gosto doce, de um sujeito através da quantificação de proteínas salivares específicas.

O referido método compreende a comparação entre as proteínas salivares marcadoras, de uma amostra de saliva a testar, com as de uma amostra de saliva padrão, i.e., com níveis de proteínas salivares conhecidos, para o gosto amargo e para o gosto doce.

A presente invenção tem aplicação no setor agroalimentar e na área da saúde, encontrando-se no domínio técnico da bioquímica e de equipamentos de medição bioquímicos.

DESCRIÇÃO

MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE GUSTATIVA BASEADA EM MARCADORES BIOQUÍMICOS SALIVARES

ÁREA TÉCNICA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método para determinação da sensibilidade gustativa, nomeadamente para o gosto amargo e para o gosto doce, de um sujeito através da quantificação de proteínas salivares específicas.

Este método é baseado na resposta salivar, apresentada por um indivíduo, ao nível de proteínas salivares específicas, sendo as proteínas relevantes produzidas pela saliva, como a anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e leptina.

O referido método compreende a comparação entre as proteínas salivares marcadoras de uma amostra de saliva a testar com as de uma amostra de saliva padrão, i.e., com níveis de proteínas salivares conhecidos, para o gosto amargo e para o gosto doce.

A presente invenção tem aplicação no setor agroalimentar e na área da saúde, encontrando-se no domínio técnico da bioquímica e de equipamentos de medição bioquímicos.

ESTADO DA TÉCNICA

A sensibilidade gustativa não é a mesma para todos os indivíduos e afeta a forma como os mesmos aceitam e escolhem os alimentos. A nível do setor agroalimentar a existência de painéis de provadores é de grande importância na avaliação da qualidade sensorial dos produtos. Essa importância é tanto maior quanto mais elevado for o valor económico do produto alimentar em causa. No entanto, o processo de seleção dos indivíduos a constituir o painel é um processo moroso, que se baseia na testagem de diferentes estímulos sensoriais e em respostas subjetivas, envolvendo custos económicos.

Também na área da saúde, a sensibilidade gustativa, e particularmente o gosto amargo, tem um papel importante, nomeadamente em termos de aceitação e escolhas alimentares, principalmente no que respeita a alimentos de origem vegetal, que poderão, posteriormente, conduzir a doenças crónicas não transmissíveis associadas à alimentação, como são os casos da obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, etc. Tendo em conta a relevância que a perceção do gosto tem na aceitação e preferências alimentares, o conhecimento do fenótipo gustativo do indivíduo pode ajudar a desenvolver terapias nutricionais individualizadas.

São conhecidas variações inter-individuais na sensibilidade gustativa. A variação genética na sensibilidade aos compostos amargos feniltiocarbamida (**PTC**) e 6-n-propiltiouracil (**PROP**) resulta no fenótipo de gosto amargo mais estudado em humanos (Tepper, 2008). Assim, se diferentes indivíduos podem apresentar diferentes sensibilidades para o gosto amargo, também é expectável que possam apresentar diferentes sensibilidades para outros tipos de gostos básicos.

O conhecimento do fenótipo, em termos de sensibilidade gustativa, ao qual cada indivíduo pertence (sensível ou pouco sensível) é relevante, tanto para a indústria agroalimentar como para a área da saúde, em especial da nutrição.

Produtos agroalimentares com grande importância económica, como por exemplo, vinho, azeite, café, são geralmente submetidos a avaliação por painéis de provadores, constituídos por especialistas.

No entanto, as empresas agroalimentares têm custos associados à constituição desses painéis, os quais dependem de pessoas com elevada sensibilidade sensorial. A seleção de indivíduos para constituir painéis de provadores é demorada, uma vez que se baseia numa avaliação subjetiva de estímulos, sendo os dados submetidos à análise estatística antes de uma classificação final (ISO 8586-2012).

No setor da saúde, em particular da nutrição, o conhecimento da acuidade sensorial dos indivíduos, incluindo a sensibilidade gustativa, começa a ganhar importância, pois há evidências de que a sensibilidade gustativa pode estar relacionada com a aceitação de alimentos (Sandell et al., 2014), ou mesmo com o índice de massa corporal (Felsted et al., 2007). Como tal, o conhecimento do fenótipo gustativo de um indivíduo pode ser útil para direcionar dietas personalizadas com maiores taxas de sucesso.

A sensibilidade gustativa é, correntemente, avaliada através de testes baseados na prova de soluções com estímulos sensoriais ou no uso de tiras impregnadas nesses estímulos (Smutzer et al., 2013).

Outras das formas de avaliação recorre ao uso de testes em que há estimulação das células recetoras do gosto através de estímulos elétricos (Sollai et al., 2017).

Contudo, até agora, não existe um método para avaliar a sensibilidade gustativa, de forma prática, objetiva e simples em apenas um passo.

Métodos de classificação de indivíduos através da sensibilidade gustativa

A. Sensibilidade gustativa ao gosto amargo

Para a classificação de indivíduos de acordo com a sensibilidade para o gosto amargo, o método mais utilizado consiste em avaliar a intensidade ou nível de resposta ao gosto do composto PROP. Vários métodos psicofísicos estão disponíveis para classificar os indivíduos pelo *status* de provador PROP.

Lawless (1980) desenvolveu um método de triagem simples que envolve a prova de uma única solução de PROP com concentração acima do limiar inferior e onde é pedido para referir a intensidade percebida dessa solução.

Técnicas de deteção de limiares inferiores (*threshold*) têm sido também bastante utilizadas (Bartoshuk et al., 1994). Nestes casos, avalia-se a concentração mais baixa do estímulo que é percebida.

No entanto, esses métodos são exigentes em termos de tempo e trabalho e requerem que os participantes provem um número elevado de amostras.

Por outro lado, cada um dos métodos, isoladamente, não consegue avaliar a dimensão total da percepção, ou seja, o conhecimento dos limiares de detecção não permite prever a intensidade máxima percebida do estímulo (*suprathreshold*) e vice-versa (Bartoshuk et al., 1994).

Um dos métodos descrito para a classificação rápida de indivíduos consistiu na utilização de tiras de papel de filtro impregnadas com PTC ou PROP (Smutzer et al. 2013).

No entanto, é possível a existência de respostas falsos positivos com esta metodologia, onde indivíduos pouco sensíveis reportam como gosto amargo o gosto do papel.

Em 1994, Bartoshuk e colaboradores (Bartoshuk et al., 1994) propuseram um método baseado na classificação de limiares de detecção (*thresholds*) e limiares de tolerância (*suprathreshold*). Neste método, os indivíduos avaliam cinco concentrações de PROP e cinco concentrações de cloreto de sódio (NaCl), usando uma escala marcada de magnitude.

Este método assenta no princípio de que a sensibilidade ao gosto salgado do NaCl não varia em função da variação na resposta ao PROP (Bartoshuk et al., 1994), sendo o NaCl utilizado como referência padrão para comparação com o PROP.

Diferentes estudos mostram que indivíduos pouco sensíveis (*nontasters*) classificam as soluções de NaCl com menor intensidade do que as soluções de PROP, indivíduos com

sensibilidade intermédia (*medium-tasters*) classificam de modo semelhante os dois conjuntos de soluções e indivíduos muito sensíveis (*supertasters*) classificam as soluções de PROP com maior intensidade do que as de NaCl (Drewnowski et al., 1998). Através da adaptação do método acima referido e desenvolvido por Bartoshuk et al. (1994), Tepper et al (2001), desenvolveram um método um pouco mais simples e fiável para classificar indivíduos com base na sensibilidade gustativa ao PROP.

O procedimento consiste na prova de três soluções de PROP (0,032; 0,32 e 3,2mmol/L) e três soluções de NaCl (0,01; 0,1 e 1,0mmol/L) com concentrações crescentes, representando as concentrações mais elevadas, médias e baixas utilizadas em estudos anteriores (Bartoshuk et al., 1994). Neste método é utilizado uma escala de magnitude rotulada (*Labeled Magnitude Scale* - LMS) para classificar a intensidade das soluções.

Uma LMS é uma escala quase logarítmica com rótulos equivalentes à magnitude estimada (Green et al., 1993), apresentando na extremidade inferior a frase "escassamente detetado" e na extremidade superior a frase "mais forte que o imaginável". Esta escala permite que os indivíduos classifiquem livremente a intensidade do estímulo em relação ao estímulo oral "mais forte que o imaginável" que conhecem da experiência quotidiana. Esta escala contrasta com outras escalas de classificação padrão, nas quais as respostas são limitadas aos rótulos "muito forte" ou "extremamente forte".

A escala LMS é útil para quantificar vários tipos de sensações orais, particularmente aquelas que são fortes ou persistentes, como o amargo e a adstringência (Green et al., 1993). Este método é aplicável a adultos e crianças, desde que as mesmas tenham idade suficiente para compreender o seu funcionamento

e é atualmente utilizado em estudos sobre percepção humana de consumo e investigações epidemiológicas.

No entanto, e tendo em conta que diferentes indivíduos têm diferentes experiências sensoriais, a avaliação feita através desta escala também encerra em si alguma subjetividade, com classificações como "mais forte que o imaginável" a dependerem muito da intensidade de estímulos a que os indivíduos estão habituados.

B. *Sensibilidade gustativa ao gosto doce*

De modo semelhante ao amargo, também o gosto doce tem um papel relevante nas escolhas alimentares. Por oposição ao amargo, que está associado à rejeição inata, a percepção do doce relaciona-se com o prazer e é um impulso para a ingestão (Swithers et al., 2010).

Diferenças inter-individuais na sensibilidade foram também reportadas para o gosto doce (Fushan et al., 2010). No entanto, não existe nenhum teste semelhante para avaliação da sensibilidade ao gosto doce.

A percepção deste gosto pode ser avaliada através da avaliação de limiares de deteção (*thresholds*) ou limiares de tolerância (*suprathresholds*) (Weiffenbach et al., 1982; Jones, 1956).

A metodologia utilizada para avaliar os limiares de deteção em adultos está de acordo com a norma ISO 3972, na qual são testadas oito soluções de concentração crescente de sacarose (0,34g/L; 0,55g/L; 0,94g/L; 1,56g/L; 2,59 g/L; 4,32 g/L, 7,20 g/L e 12 g/L), sendo pedido para referir se as mesmas são

semelhantes ou diferentes da água. A menor concentração identificada como diferente da água é considerada o limiar para o gosto doce. Ao contrário dos adultos, não existem concentrações de referência de estímulos gustativos a usar em testes de avaliação de sensibilidade em crianças, sendo que diferentes autores têm utilizado diferentes protocolos (Land et al., 1984; Cowart et al., 1990; Schwartz et al., 2009; Knof et al., 2011). Um dos protocolos, usado num estudo que incluiu diferentes países testou as seguintes concentrações: sacarose (8,8-46,7mmol/L), cloreto de sódio (3,4-27,4 mmol/L), cafeína (0,26-1,3mmol/L) e glutamato monossódico (MSG) (0,6-9,5mmol/L).

Fatores que contribuem para a sensibilidade gustativa

Fatores genéticos

Sabe-se que a sensibilidade ao composto PROP é influenciada por fatores genéticos e ambientais (Tepper et al., 2014). As bases genéticas subjacentes à variabilidade na sensibilidade gustativa foram descobertas acidentalmente por Arthur L Fox, em 1931, enquanto o mesmo trabalhava no processo de síntese de adoçantes não nutritivos.

Fox observou que os seus colegas apresentavam diferentes respostas ao composto amargo sintético PTC. Investigações posteriores revelaram que 30% dos indivíduos não percebem o gosto amargo deste composto, enquanto a maioria o percebe de moderado a extremamente intenso (Fox, 1932). O mesmo foi observado para o PROP, composto quimicamente semelhante ao PTC. Diversos estudos referem que a capacidade de provar o composto PROP é uma característica hereditária (Kalmus, 1958).

O gene associado à resposta aos compostos PTC e PROP é o TAS2R38, o qual expressa recetores que se ligam ao grupo N-C=S responsável pelo gosto amargo dos compostos pertencentes à classe das tioureias (Bufe et al., 2005).

A variação fenotípica na resposta ao PROP é parcialmente explicada pela diversidade alélica deste gene, a qual é devida a três polimorfismos num único nucleótido (SNPs), que resultam na substituição de três aminoácidos (Pro49Ala, Ala262Val e Val296Ile), originando dois haplotipos comuns: PAV, a variação dominante; e AVI, a variação recessiva. Indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos para o haplotipo PAV, percebem o amargo do PROP a baixas concentrações e são considerados sensíveis (*tasters*), enquanto que indivíduos que não percebem o PROP ou percebem apenas em concentrações elevadas, são homozigóticos para o haplotipo AVI e consideram-se pouco sensíveis (*nontasters*) (Wooding et al., 2004).

No entanto, estas diferenças genéticas não explicam completamente as variações observadas na sensibilidade gustativa (Hayes et al., 2008). De acordo com Genick et al., (2011), aproximadamente 30% da variação fenotípica observada pode ser explicada por outros fatores, como por exemplo alterações noutros recetores gustativos ou no ambiente oral que envolve os recetores em questão (Hayes et al., 2008). Diferenças individuais na percepção do gosto amargo provocado pelos compostos PTC/PROP têm também sido atribuídas a fatores como a composição da saliva e às propriedades físicas, número, tamanho e morfologia das papilas gustativas (Tepper et al., 2014).

Para o gosto doce, é também aceite uma explicação genética para justificar diferenças na sensibilidade entre indivíduos.

Polimorfismos ao nível do recetor para este gosto tem sido reportado por diferentes autores (por exemplo Fushan et al., 2009; Dias et al., 2015).

Papel da saliva na percepção gustativa

A saliva tem um papel reconhecido na percepção oral. Em primeiro lugar, é o meio que banha as células responsáveis pela deteção do gosto, solubilizando e transportando as moléculas presentes nos alimentos para os locais de receção do gosto.

Além disso, os constituintes salivares podem interagir com os constituintes dos alimentos, modificando a maneira como são percebidos. A partir do momento em que as moléculas sápidas têm acesso ao poro gustativo, elas interagem com os recetores nas microvilosidades da membrana plasmática, as quais se estendem da porção apical da célula gustativa.

Este processo inclui a solubilização das substâncias químicas na saliva e a sua interação com os constituintes salivares. Assim, a saliva é um elemento chave no processo inicial da transdução do gosto e as suas variações físico-químicas podem afetar a sensibilidade gustativa, bem como a integridade das células gustativas (Matsuo, 2000; Salles, 2010).

O papel da saliva na sensibilidade gustativa tem sido estudado, maioritariamente para o caso do gosto amargo. Estudos para outros gostos básicos, incluindo o gosto doce, são mais escassos e apresentam pouca informação acerca de quais as proteínas salivares que podem estar presentes em níveis diferentes em indivíduos com diferentes sensibilidades gustativas.

A anidrase carbónica VI é uma das proteínas salivares para a qual tem sido referida uma relação com a sensibilidade para o gosto amargo. Esta é uma proteína também denominada de "Gustin", com uma massa molecular de 42 kDa, que é segregada pelas glândulas salivares parótidas, submandibulares e glândulas de von Ebner glands (Henkin et al., 1975). A anidrase carbónica VI é considerada um fator trófico que promove o crescimento e desenvolvimento dos gomos gustativos, uma vez que alterações nos níveis ou atividade desta proteína são conhecidos como estando associados a diminuições na função gustativa (Henkin et al., 1999).

A secreção de anidrase carbónica VI está fortemente regulada pelo ritmo circadiano: os níveis desta proteína são mais baixos durante a noite e aumentam rapidamente após o acordar. Diferentes polimorfismos no gene que codifica esta proteína têm sido relacionados com a sensibilidade ao gosto amargo do composto PROP (Padiglia et al., 2010).

O polimorfismo rs2274333 (A/G) deste gene altera a funcionalidade da anidrase carbónica VI, tendo sido associado à resposta ao composto PROP, sendo que o alelo A deste locus está associado à resposta mais intensa ao PROP e o alelo G à resposta menos intensa (Padiglia et al., 2010).

Para além do que foi referido, diferenças nos níveis salivares desta proteína, na saliva basal, ou sem estimulação, foram sugeridas como um fator preditor da aceitação de crianças ao gosto amargo e, consequentemente, um fator preditor de sensibilidade a este gosto (Morzel et al., 2013).

No entanto, esta associação da anidrase carbónica VI à sensibilidade ao gosto amargo é um pouco controversa, com

alguns estudos a não a encontrarem. Há estudos que referem falta de relação entre os polimorfismos ao nível do gene que codifica esta proteína e a variação no fenótipo de resposta ao PROP (Genick et al., 2011; Feeney and Hayes, 2014).

Nos últimos anos surgiram alguns estudos referindo algumas outras proteínas salivares potencialmente associadas à sensibilidade para o gosto amargo, para além da anidrase carbónica VI. Por exemplo, Wada et al. (2010), observaram que a concentração de histatina 5 é significativamente mais baixa em indivíduos hipersensíveis ao gosto amargo do quinino, tendo estes autores demonstrado a capacidade desta proteína salivar para ligar o quinino. Para uma quantidade particular de quinino, os indivíduos com os níveis mais baixos de histatina 5 teriam mais quinino livre, o qual poderia atuar a nível dos recetores, aumentando assim a intensidade percebida (consequentemente, a sensibilidade).

Outro exemplo de interação entre proteínas salivares e moléculas sápidas foi apresentado por um grupo de autores italianos (Melis et al. 2013) através da demonstração, por H-NMR, que a molécula PROP pode interagir com os aminoácidos arginina e lisina. Este estudo foi feito na sequência de um outro, onde a comparação do proteoma salivar de indivíduos com respostas muito e pouco intensas ao PROP mostrou que aqueles que percebem o amargo deste composto com maior intensidade têm níveis de proteínas ricas em prolina (PRPs) básicas mais elevados do que os que respondem com baixa intensidade (particularmente de proteína Psl, a qual contém uma proporção elevada dos aminoácidos arginina e lisina) (Cabras et al., 2012).

Mounayar et al., (2014) sugeriram que a proteína zinco- α -2glicoproteína (ZAG) interage com o ácido oleico, sendo esta proteína sobre expressa num grupo de indivíduos hipersensível ao gosto deste ácido gordo. Uma das possíveis explicações, sugeridas pelos autores, é a de que esta proteína pode atuar como solvente do ácido oleico na saliva.

Apesar de menos estudada, a proteína induzida pela prolactina também poderá ter um papel na sensibilidade gustativa. Em crianças com maior aceitação para o gosto amargo, esta proteína foi observada como estando presente em níveis mais elevados, na saliva recolhida sem estimulação, comparativamente a crianças com menor aceitação (e possivelmente maior sensibilidade ao gosto amargo) (Morzel et al., 2013).

As cistatinas são inibidores de protease cisteína, as quais bloqueiam a ação endógena de proteases de bactérias protozoários parasitários. A família de genes das cistatinas humanas é constituída por 14 genes, dos quais 7 codificam cistatinas presentes na saliva, nomeadamente cistatina-A, cistatina-B, cistatina C, cistatina-D, cistatina-S, cistatina-SA e cistatina-SN. A maior concentração de cistatinas salivares, diz respeito às cistatinas do tipo-S e encontra-se na saliva proveniente das glândulas submandibulares, apesar destas proteínas estarem presentes também na saliva proveniente das glândulas parótidas, mas em menor concentração (Fabián et al., 2015).

Apesar da informação existente ser um pouco contraditória, no que diz respeito ao sentido em que os níveis de cistatinas estão associados à sensibilidade, nomeadamente se estão aumentados (Igarashi et al., 2008) ou diminuídos (Dsamou et al., 2012) em indivíduos mais sensíveis, a existência de

relação entre estas proteínas e a sensibilidade para o gosto amargo parece ser de considerar.

Ao observar níveis de cistatina-SN mais elevados em homens pouco sensíveis para o gosto amargo, Dsamou et al., (2012) colocaram a hipótese de que esta proteína pudesse ter uma função inibidora de proteases, impedindo assim ação proteolítica potencialmente necessária para permitir o acesso das moléculas amargas aos recetores gustativos.

Uma aceitação mais elevada para soluções amargas (o que é expectável estar associado a uma menor sensibilidade para este tipo de gosto) foi também associada a níveis de cistatinas mais elevados em crianças (Morzel et al., 2013). As cistatinas salivares foram também referidas como potencialmente associadas à percepção de adstringência, uma vez que as mesmas têm capacidade para complexar polifenóis (Dinnella et al., 2009).

Certos polipéptidos metabólicos, como a leptina, grelina, insulina, neuropeptido Y e péptido YY estão presentes na saliva e os seus recetores são expressos nas células recetoras do gosto, sugerindo que estes péptidos possam ter ação direta na função gustativa (Fabian et al., 2015). No caso da leptina, foi colocada a hipótese desta hormona poder atuar nas células responsáveis pela receção do gosto doce. No caso da grelina, uma hormona convencionalmente considerada como reguladora do apetite, parece ter um papel noutras ações relacionadas com o comportamento de ingestão. Esta hormona é processada a partir de um precursor maior e de uma enzima, denominada PC1/3 convertase.

Estudos recentes mostram a presença deste precursor e da enzima convertase nas células recetoras do gosto. O péptido semelhante à glucagina (*Glucagon-like peptide* - GLP-1) também foi associado à sensibilidade gustativo. Estudos recentes observaram que uma quebra na sinalização do GLP-1 resulta num decréscimo significativo da sensibilidade para o gosto doce e num aumento da sensibilidade para o gosto umami e para o gosto ácido, em modelo animal rato. O péptido YY, indutor de saciedade, produzido no intestino, também foi referido como responsável por modular a resposta ao gosto amargo e a emulsões lipídicas (La Sala et al., 2013).

A principal enzima digestiva, presente na saliva, é a alfa-amilase. Esta proteína tem como função principal iniciar a digestão do amido dos alimentos, através da hidrólise da ligação α -1: 4 glicosídea entre as unidades de glucose, na molécula de amido. Os produtos finais da digestão da amilase são principalmente moléculas de maltose, juntamente com oligossacáridos (Harris et al., 1998).

O possível envolvimento desta proteína na percepção sensorial dos alimentos foi sugerido por diversos autores, nomeadamente pela sua influência na percepção de viscosidade do amido (Mandel et al., 2010) e na textura de alimentos semi-sólidos (Engelen et al., 2007).

Existe também um estudo recente que refere a presença de recetores gustativos nas células acinares e dos ductos das glândulas salivares, sugerindo uma possível regulação da secreção salivar pela amilase (Dasso et al., 2011).

Caso esta regulação se confirme, isto ajuda a reforçar a existência de uma inter-relação entre a expressão de amilase

salivar e a percepção gustativa. Os níveis de expressão desta proteína dependem de vários fatores, incluindo hábitos alimentares (Perry et al., 2007), saciedade percebida (Harthoorn et al., 2007) e da atividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo (Miller et al. 2010). Estudos realizados por Gidez (1973), em roedores, mostram que uma dieta rica em amido resulta no aumento dos níveis de amílase salivar. Estudos realizados pela nossa equipa também têm vindo a suportar a hipótese de que a amílase salivar possa influenciar a percepção gustativa.

Efeito da idade e sexo na sensibilidade gustativa

A idade e o sexo são dois fatores que têm sido alvo de estudo em termos de sensibilidade gustativa. Vários grupos de investigadores mostram que há alterações na sensibilidade gustativa induzidas pela idade e que essas alterações são dependentes do tipo de gosto. O gosto doce tem sido um dos gostos mais estudados em termos de influência da idade e do sexo na sensibilidade (Mojet et al, 2001). Enquanto alguns estudos observaram decréscimos na sensibilidade ao gosto doce, com o aumento da idade, outros não encontraram diferenças significativas, na sensibilidade a este gosto, entre crianças e adultos (Yamauchi and Yoshimura, 2002; Nordin et al., 2003). A idade e o sexo são fatores determinantes nos limiares de deteção da sacarose.

Um estudo recente demonstrou que as crianças mais novas são menos sensíveis ao gosto doce que os adolescentes e que os rapazes são menos sensíveis que as raparigas (Joseph et al., 2016).

Este estudo observou que os efeitos da idade e sexo, na sensibilidade gustativa, durante a infância e adolescência, parecem observar-se apenas para o gosto doce, não tendo observado diferenças para os outros gostos básicos.

Yoshinaka e colaboradores (Yoshinaka et al., 2015) observaram que adultos jovens têm limiares de reconhecimento, para os quatro gostos básicos, mais baixos que os adultos mais velhos. Os mesmos autores também referiram que, dentro do grupo de indivíduos mais velhos, as mulheres têm limiares de reconhecimento mais baixos para o amargo, ácido e salgado, comparativamente aos homens. No entanto, esta diferença não se observa para o gosto doce.

Alguns estudos reportaram diminuições na sensibilidade para o gosto amargo com a idade (Nordin et al., 2003), enquanto em outros essa relação não se observou (Cowart, 1989). Também alguns estudos sugerem um decréscimo na sensibilidade para o salgado e amargo à medida que a idade aumenta (Nordin et al. 2003; Yamauchi et al., 2002).

Em 1959, Cohen e Gitman investigaram a sensibilidade para os quatro gostos básicos, sugerindo que, em geral, os homens têm mais dificuldade em reconhecer os gostos, comparativamente às mulheres. Wardwell e colaboradores (Wardwell et al., 2009) observaram que os limiares de reconhecimento para os gostos doce e amargo são afetados pelo sexo em adultos mais velhos, mas não em adultos jovens, enquanto que os limiares de reconhecimento para os gostos ácido e salgado são afetados pelo sexo em ambos os grupos de adultos.

Yamauchi e colaboradores (Yamauchi et al., 2002) reportaram diferenças significativas nos limiares de deteção do gosto

amargo entre homens e mulheres. No entanto, estes autores não observaram diferenças, entre os sexos, para os outros gostos básicos

Em suma, apesar da falta de consenso, muitos destes estudos apontam no sentido de um declínio na sensibilidade gustativa com a idade e em diferenças entre sexos.

Implicações Nutricionais da Sensibilidade Gustativa

Diversos estudos sugerem que o fenótipo PROP pode servir como marcador geral de sensibilidade para as sensações orais e preferências alimentares, podendo assim estar relacionado com o comportamento alimentar e o estado nutricional. (Tepper, 2008). É referido que os indivíduos muito sensíveis ao composto PROP têm uma sensibilidade mais elevada para os restantes estímulos orais, que os pouco sensíveis, incluindo outros compostos e alimentos amargos, como o chocolate negro, café, soluções de cafeína, produtos à base de soja, chá verde (Akella et al., 1997), substâncias doces, irritantes químicos (chili ou etanol), bem como a textura dos alimentos ricos em gordura (Hayes e Duffy, 2007).

Outros estudos demonstram que aqueles indivíduos que percebem o composto PROP como extremamente amargo são, normalmente, aqueles que apresentam uma menor aceitação por vegetais da família das Brássicas e por frutos amargos, sendo também indivíduos que evitam versões com níveis elevados de amargo de alimentos que normalmente não contêm grupos tiureia, incluindo alimentos condimentados e algumas bebidas alcoólicas (Keller et al., 2002; Drewnowski et al. 2000; Sandell et al., 2014).

A sensibilidade para o composto PROP está também associada à neofobia alimentar e a um menor consumo de frutos, vegetais e alimentos picantes (Monneuse et al., 2008).

Dada a importância nutricional dos lípidos presentes na dieta, a relação entre o PROP *status* e a percepção do "gosto" da gordura foi extensivamente investigada. A maioria dos estudos (Tepper & Nurse, 1997; Duffy & Bartoshuk, 2000; Hayes e Duffy, 2007; 2008), mas não todos (Martínez-Ruiz, 2014; O'Brien et al, 2013), relataram que os indivíduos pouco sensíveis para PROP tinham uma menor capacidade de distinguir o teor de gordura e a cremosidade em certos alimentos gordurosos e apresentavam maiores preferências por gordura na dieta.

A preferência por alimentos doces e com alto teor de gordura é frequentemente relatada como estando associada ao desenvolvimento de obesidade. Isto porque pessoas obesas parecem ter maiores preferências por doces e gorduras e a sua resposta positiva à gordura torna-se ainda maior quando o doce é adicionado a alimentos gordurosos (Donaldson et al. 2009); para além disso, diferentes autores referem associação entre a percepção do gosto doce e o peso corporal (Monneuse et al. 2008; Simchen et al. 2006), sendo os limiares de deteção/reconhecimento deste gosto significativamente menores em adolescentes obesos mórbidos (Pasquet et al. 2007).

Estudos recentes sugeriram que os indivíduos obesos percebem o gosto doce de forma menos intensa do que os indivíduos normoponderais e apresentam maior preferência por este (Bartoshuk et al., 2006).

Por outro lado, outros estudos mostraram que indivíduos com IMC elevado têm menos prazer na ingestão de alimentos doces em

comparação com indivíduos de IMC baixo (Felsted et al, 2007), havendo autores que reportam variações na percepção do gosto doce entre indivíduos com diferentes IMCs (Anderson, 1995).

Apesar de alguns documentos já terem sugerido diferenças na composição proteica da saliva, entre indivíduos com diferentes sensibilidades gustativas (ex. Dsamou et al., 2012; Cabras et al., 2012), há algumas contradições entre documentos diferentes. Para além disso, esses documentos não referem a possibilidade de utilizar essas, ou combinação dessas proteínas salivares, para discriminar e selecionar os indivíduos pela sua sensibilidade gustativa, de forma rápida e objetiva.

De realçar ainda que os estudos publicados, até ao momento, referem diferenças na sensibilidade para o gosto amargo associadas à composição da saliva recolhida num determinado ponto do tempo, não tendo informação acerca da dinâmica da saliva quando há estimulação gustativa. No caso de sensações como a adstringência, sabe-se que, mais do que a composição da saliva não-estimulada, é a variação na composição desse fluido em resposta ao estímulo que está associada à intensidade percebida (Dinnella et al., 2009).

Os métodos para avaliação da sensibilidade gustativa, que existem atualmente, são pouco práticos, morosos, caros e têm muita subjetividade implícita.

Assim, com o objectivo de resolver os problemas dos métodos do estado da técnica acima mencionados, a presente invenção propõe um método para determinação e avaliação da sensibilidade gustativa, nomeadamente para o gosto amargo e para o gosto doce, de um sujeito, através da quantificação de proteínas salivares específicas, por ELISA.

De acordo com o método agora proposto, é possível comparar-se a quantidade de proteínas específicas, na saliva de um sujeito, num dado momento, bem como se comparar as diferenças na resposta ao estímulo amargo, no que diz respeito às quantidades dessas proteínas.

Para além disso, no caso particular das crianças e da deteção dos indivíduos (adultos e crianças) de acordo com a sua sensibilidade ao gosto doce, não foram, até ao momento, apresentadas proteínas ou combinação de proteínas capazes de discriminar os indivíduos relativamente à sensibilidade para este gosto.

O método da invenção permite assim realizar uma avaliação objetiva (uma vez que se baseia na quantificação de moléculas biológicas e não no reportar) de uma forma prática e rápida, com a vantagem de não ser invasivo.

Para além das vantagens apresentadas, este método é passível de aplicação "point-of-care", quando inclui tecnologias de biossensores utilizando fluorescência e "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA).

DESCRIÇÃO DA CONCRETIZAÇÃO PREFERIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método para determinação e quantificação da sensibilidade gustativa, nomeadamente para o gosto amargo e para o gosto doce, de um sujeito através da quantificação de proteínas salivares específicas. Através da implementação deste método é possível classificar indivíduos de acordo com a sua sensibilidade gustativa, podendo essa classificação ser usada, vantajosamente, na selecção de painéis de provadores.

Este método é baseado na resposta salivar, apresentada por um indivíduo, ao nível de proteínas salivares específicas, sendo as proteínas relevantes produzidas pela saliva, como a anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amilase e leptina, quantificadas através ELISA.

O referido método compreende a determinação e quantificação de proteínas salivares marcadoras de uma amostra de saliva a testar com as de uma amostra de saliva padrão, i.e., com níveis de proteínas salivares conhecidos, para o gosto amargo e para o gosto doce.

No caso avaliação da sensibilidade para o gosto amargo, é necessário realizar um passo adicional de recolha de uma segunda amostra de saliva, após fornecimento de um estímulo com o composto amargo PROP, a qual é igualmente quantificada e comparada com uma amostra padrão.

No desenvolvimento do presente método, seleccionou-se a saliva como fonte de proteínas marcadoras, para a sensibilidade gustativa, pelas seguintes razões:

1. A recolha de amostras de saliva é um procedimento não-invasivo, o qual que pode ser realizado em qualquer ambiente, não necessitando de treinos especiais ou equipamento particular, especialmente concebido para o efeito,
2. A fisiologia da cavidade oral permite que este fluido seja secretado continuamente, estando assim permanentemente disponível.

Desta forma, são obtidos níveis quantitativos de grupos de marcadores bioquímicos, nomeadamente de anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amilase e leptina, a partir de amostras de saliva recolhidas diretamente da boca dos indivíduos.

1. Recolha de amostra de saliva

A primeira recolha de saliva é feita em condições de ausência de estimulação, pela "queda" passiva da saliva que vai sendo produzida pelo sujeito, durante cerca de 5 minutos, para um tubo de propileno mantido em gelo. Os tubos são armazenados a -20°C, sendo as amostras posteriormente descongeladas em gelo e centrifugadas, durante 30 minutos, a 4°C, 13000 g, para remoção de células e mucinas.

Esta recolha ocorre cerca de 1h após a ingestão de alimentos ou bebidas, que não água, e sem qualquer tipo de estimulação, como por exemplo, através de drenagem da saliva diretamente da boca do indivíduo.

Como referido anteriormente, a avaliação da sensibilidade para o gosto amargo requer duas recolhas de saliva, do mesmo sujeito, uma antes e outra imediatamente a seguir ao estímulo com o

composto amargo PROP. Em seguida, a segunda recolha de saliva é realizada da mesma forma, tal como acima descrito.

2. Determinação e quantificação de proteínas marcadores

As amostras de saliva obtidas, tanto na primeira recolha, portanto, antes da estimulação com PROP, como na segunda recolha, portanto após estimulação com PROP, são analisadas utilizando-se as metodologias bioquímicas detalhadas adiante, sendo, em seguida, realizada a comparação das composições proteicas de:

- a) entre a amostra de saliva da primeira recolha com uma amostra de saliva padrão,
- b) entre a amostra de saliva da segunda recolha com uma amostra de saliva padrão, e
- c) entre a amostra de saliva da segunda recolha com a amostra de saliva da primeira recolha, para determinação da sensibilidade gustativa ao sabor amargo.

As proteínas usadas como marcadores para a determinação da sensibilidade gustativa ao sabor amargo, no âmbito da presente invenção, são as proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S e alfa amilase.

Na avaliação da sensibilidade para o gosto doce, são usadas as mesmas proteínas salivares referidas para o gosto amargo, acrescidas da proteína/hormona leptina, usada apenas para marcação do gosto doce, sendo o procedimento de determinação e quantificação proteica realizada de forma análoga à descrita acima, numa amostra de saliva recolhida sem necessidade de estimulação com o composto PROP.

A concentração proteica total, presente nas amostras de saliva recolhidas, antes ou após estimulação com PROP, é determinada pelo método de Bradford, usando-se a albumina de soro bovino como padrão.

A quantificação, individual das proteínas salivares, anteriormente referidas como proteínas marcadores, em particular de anidrase carbônica VI, cistatina S, alfa amilase e leptina, em termos de massa por unidade de volume de saliva, é realizada através de técnicas de ELISA convencionais, com anticorpos primários específicos para as respectivas proteínas salivares referidas.

No que diz respeito aos níveis de proteína alfa-amilase, estes são ainda determinados através da medição da sua atividade enzimática. Esta determinação é feita através da diluição da amostra de saliva 200 vezes. Um volume desta amostra é aplicado numa placa de 96 poços, em triplicado, seguida da aplicação de um volume 40 vezes superior de substrato. O substrato a usar é o 2-cloro-p-nitrofenol, pré-aquecido a 37°C. A absorvância é lida a 405nm em dois momentos distintos: após a mistura da saliva diluída com o substrato e 2 minutos após a primeira leitura. A diferença entre as duas leituras permite obter a atividade enzimática desta proteína.

Assim, as proteínas salivares são quantificadas de forma objetiva, rigorosa e reprodutível para cada amostra de saliva proveniente de cada indivíduo testado.

3. Classificação de sujeitos

As quantidades presentes na amostra de saliva, recolhida antes da estimulação com o composto amargo PROP, e aqueles presentes na amostra de saliva recolhida após essa estimulação, são então determinadas e relacionadas, sendo as variações obtidas, entre os níveis presentes antes e depois da estimulação, assim como a combinação destas variações das diferentes proteínas, de acordo com o descrito acima.

Para avaliação da sensibilidade para o gosto doce, são usadas as mesmas proteínas salivares referidas para o gosto amargo, acrescidas da proteína/hormona leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, sendo o procedimento de determinação e quantificação proteica realizada de forma análoga à descrita acima, numa amostra de saliva recolhida, mas sem necessidade de estimulação com o composto PROP.

Após se obter os vários valores de quantificação de proteínas salivares de um determinado sujeito, procede-se à sua comparação com valores conhecidos de proteínas salivares obtidos a partir da recolha de amostras de saliva provenientes de indivíduos considerados como controlo ou padrão. Indivíduos considerados como controlo ou padrão são aqueles que apresentam níveis de sensibilidade gustativa baixa ou mediana.

Por outro lado, indivíduos com elevada sensibilidade, quer para o gosto amargo, quer para o gosto doce são aqueles cujos valores dos marcadores salivares apresentam variações superiores ou inferiores relativamente ao controlo. Isto aplica-se tanto à deteção da sensibilidade para o gosto amargo, como a deteção da sensibilidade para o gosto doce.

Assim, através da quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S e alfa amílase, de um indivíduo, e por comparação com padrões de proteínas salivares conhecidos, provenientes de um ou mais indivíduos considerados como controlo ou padrão, consegue-se determinar a sensibilidade gustativa desse indivíduo para o gosto amargo e, pela quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, desse mesmo indivíduo, e por comparação com padrões de proteínas salivares conhecidos, provenientes de um ou mais indivíduos considerados como controlo ou padrão, consegue-se determinar a sensibilidade gustativa do referido indivíduo para o gosto doce.

Numa forma de realização preferencial, são selecionadas as classificações com valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e/ou leptina mais elevados que os valores de proteínas salivares padrão ou de referência.

Numa outra forma de realização preferencial, são selecionadas as classificações com valores de proteínas salivares cistatinas e/ou albumina mais elevados do que os valores de referência, e/ou valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI, leptina e/ou α -amílase inferiores aos valores de referência.

Ainda numa outra forma de realização preferencial, são selecionadas as classificações com valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e leptina mais elevados que os valores de proteínas salivares padrão ou de referência.

De acordo com o acima descrito, o método para determinação da sensibilidade gustativa da presente invenção, para o gosto amargo e para o gosto doce, compreende os seguintes passos:

- a) quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amilase e leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, presentes numa amostra de saliva de um indivíduo, sem estimulação prévia (1ª recolha)
- b) quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amilase e leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, presentes numa amostra de saliva de um indivíduo, após estimulação com o composto PROP (2ª recolha),
- c) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, referidas em a), por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 1ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes numa amostra de saliva padrão,
- d) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, referidas em b), por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 2ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes numa amostra de saliva padrão, e
- e) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, referidas em b), por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 1ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 2ª recolha.

O método compreende a obtenção de uma amostra de saliva de um indivíduo, pelo menos 1h depois de ingerir alimentos ou bebidas,

que não água, e sem qualquer tipo de estimulação, como por exemplo, através de drenagem da saliva diretamente da boca do indivíduo, seguida da deteção de alterações nos níveis de marcador(es) bioquímico(s) salivar(es).

Preferivelmente os indivíduos são adultos do sexo masculino, com um homem apresentando uma sensibilidade elevada para o gosto amargo a ter níveis de uma ou várias das seguintes proteínas alterados, relativamente à referência: cistatinas do tipo S e alfa amílase com valores inferiores aos valores de referência.

Contudo, os indivíduos podem também ser adultos do sexo feminino, com uma mulher apresentando elevada sensibilidade para o gosto amargo a ter níveis de uma ou várias das seguintes proteínas alteradas, relativamente à referência: cistatinas do tipo S, alfa amílase e/ou anidrase carbónica VI, com valores inferiores aos valores de referência.

Ainda, os indivíduos podem ser crianças do sexo masculino, em que um rapaz apresentando elevada sensibilidade para o gosto amargo tem os níveis de uma ou várias das seguintes proteínas alterados, relativamente à referência: alfa amílase e/ou anidrase carbónica VI, com valores inferiores aos valores de referência, e/ou albumina com valores mais elevados do que os valores de referência.

Os indivíduos também podem ser crianças do sexo feminino, em que uma rapariga apresentando elevada sensibilidade para o gosto amargo tem os níveis de uma ou várias das seguintes proteínas alteradas, relativamente à referência: α -amilase com valores inferiores aos valores de referência e/ou anidrase carbónica VI com valores mais elevados do que os valores de referência.

Lisboa, 5 de Maio de 2022

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinação da sensibilidade gustativa para o gosto amargo e para o gosto doce **caracterizado por** compreender os seguintes passos:
 - a) quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, presentes numa amostra de saliva de um indivíduo, sem estimulação prévia, assim definindo a 1ª recolha,
 - b) quantificação das proteínas salivares anidrase carbónica VI, cistatina S, alfa amílase e leptina, em que a leptina é usada apenas para marcação do gosto doce, presentes numa amostra de saliva de um indivíduo, após estimulação com o composto 6-n-propiltiouracil, definindo assim a 2ª recolha,
 - c) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 1ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes numa amostra de saliva padrão,
 - d) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 2ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes numa amostra de saliva padrão, e
 - e) deteção de alterações de valores relativos às concentrações das proteínas salivares, por comparação entre as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva da 1ª recolha com as concentrações das proteínas salivares presentes na amostra de saliva

da 2ª recolha, em que em resultado da medição das concentrações das proteínas e da sua comparação, tal como descritas nas alíneas anteriores, se considera que:

- quando a alteração na concentração das proteínas medidas e comparadas, de acordo com o descrito nas alíneas anteriores, apresenta um aumento na concentração de alfa-amilase, anidrase carbónica VI e de leptina, em relação à amostra padrão, significa pouco sensível ao doce;
 - quando a alteração na concentração das proteínas medidas e comparadas, de acordo com o descrito nas alíneas anteriores, apresenta uma diminuição da concentração de alfa-amilase, anidrase carbónica VI e de leptina e um aumento da concentração de cistatina S significa muito sensível ao doce.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** serem selecionados os resultados com valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI superior e de e cistatina S inferior relativamente aos valores destas proteínas salivares da amostra padrão ou de referência, significa muito sensível ao gosto amargo.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** serem selecionados os resultados com valores de proteínas salivares cistatina S e/ou albumina mais elevados do que os valores de referência, e/ou valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI inferiores aos valores de referência, significa pouco sensível ao gosto amargo.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** serem selecionados os resultados com valores de proteínas salivares anidrase carbónica VI e cistatina S mais elevados

na amostra da 1^a recolha do que os valores destas proteínas salivares na amostra da 2^a recolha, significa muito sensível ao gosto amargo.