

**LUCIMARI TEIXEIRA ESSENFELDER**

**ESTUDO DA AÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASES NA VOLATILIZAÇÃO DE  
COMPOSTOS AROMÁTICOS EM SALIVA HUMANA E SUA POSSÍVEL  
RELAÇÃO COM HALITOSE.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em  
Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Estado  
de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.  
Orientador: Maria de Lourdes Borba Magalhães

**LAGES  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Essenfelder, Lucimari Teixeira

Estudo da ação de B-glicosidases na volatilização de compostos aromáticos em saliva humana e sua possível relação com halitose /

Lucimari Teixeira Essenfelder. -- 2019.

76 p.

Orientador: Maria de Lourdes Borba Magalhães

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Lages, 2019.

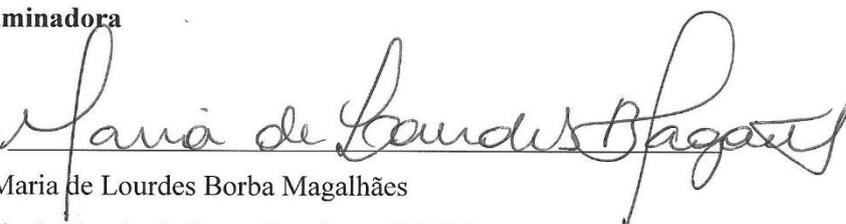
1. B-glicosidase. 2. Saliva. 3. Halitose. 4. Biofilme. 5. Xilitol. I. Magalhães, Maria de Lourdes Borba. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. III. Título.

**LUCIMARI TEIXEIRA ESSENFELDER**

**ESTUDO DA AÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASES NA VOLATILIZAÇÃO DE  
COMPOSTOS AROMÁTICOS EM SALIVA HUMANA E SUA POSSÍVEL  
RELAÇÃO COM HALITOSE.**

Dissertação apresentada no programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

**Banca Examinadora**

Orientador:   
Prof. Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro:   
Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro:   
Prof. Dr. Diogo Robl  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

**LAGES, SC, 15 de fevereiro de 2019**



## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e por sempre estar comigo em todos os caminhos que já trilhei e que ainda estão por vir.

Aos meus pais por toda a dedicação, paciência e incentivo.

Ao meu esposo Alanderson por todo amor, companheirismo e apoio.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Maria de Lourdes Borba Magalhães por me incentivar, acreditar no meu potencial e me auxiliar a superar inúmeras limitações.

Ao meu amigo Anderson Albino Gomes por toda dedicação, amizade, paciência e por contribuir imensamente para o meu crescimento durante o curso.

A toda equipe do LABHEV e do CEDIMA que foram amigos e suporte para que os frutos desta pesquisa pudessem ser colhidos.

A todos os professores envolvidos no programa de Pós-graduação pelos ensinamentos, críticas construtivas e por serem inspiração.

Ao cirurgião dentista e Prof. Dr. César Poletto que gentilmente cedeu seu espaço de trabalho, o consultório odontológico do CAV, para que eu pudesse realizar a parte clínica deste estudo.

A todos os voluntários que participaram desta pesquisa e que enriqueceram este trabalho.



## RESUMO

TEIXEIRA, L. **Estudo da ação de  $\beta$ -glicosidases na volatilização de compostos aromáticos em saliva humana e sua possível relação com halitose.** 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.

$\beta$ -glicosidases são enzimas biologicamente ativas presentes em muitos organismos vivos. Possuem papel importante para obtenção energética e podem participar de reações de síntese e quebra de oligossacarídeos. São de interesse para biotecnologia por estarem associadas a liberação de moléculas voláteis e aromáticas, podendo ser utilizadas para enriquecimento de alimentos e bebidas. Pouco se sabe sobre  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e sua relação com condições bucais. Estudos prévios indicam a presença destas enzimas na saliva de pacientes com doenças periodontais, enquanto outros sugerem que estas enzimas podem estar associadas a uma percepção diferenciada do paladar. Neste contexto, este estudo buscou determinar a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e sua possível relação com a presença de biofilme dental, volatilização de compostos aromáticos associados a halitose e a possível ação do xilitol sobre estas enzimas. Para tanto, amostras de saliva de 48 voluntários (selecionados e adequadamente orientados) foram analisadas por meio de ensaios enzimáticos com o substrato cromogênico p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG) buscando-se determinar a atividade de enzimas  $\beta$ -glicosidases neste fluido corporal. A possível ação do xilitol sobre a enzima foi investigada por ensaios com pNPG na ausência e na presença de xilitol. Os dados foram relacionados com condições clínicas observadas no exame odontológico individual. Os resultados indicam que  $\beta$ -glicosidases salivares possuem origem bacteriana e que pacientes com acúmulo de biofilme dental e halitose apresentam maior atividade  $\beta$ -glicosidásica. Além disso, análises por cromatografia gasosa mostraram a capacidade de enzimas  $\beta$ -glicosidases exógenas (provenientes de *Bacillus polymyxa*) em modificar o perfil aromático de amostras de saliva, sugerindo que a presença destas enzimas pode favorecer a liberação de compostos voláteis aromáticos e ser um dos fatores associados a halitose de origem bucal. O xilitol inibiu a enzima de forma não competitiva, portanto, sugerimos que a inibição sobre  $\beta$ -glicosidases pode ser umas das explicações para a ação antiaderente já conhecida do xilitol.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glicosidase. Saliva. Halitose. Biofilme. Xilitol.



## ABSTRACT

TEIXEIRA, L. **Study of  $\beta$ -glucosidase activity on the volatilization of aromatic compounds in human saliva and its possible relation with halitosis.** 2019. Dissertation (Master's degree in Biochemistry and Molecular Biology) - State University of Santa Catarina, Lages, 2019.

$\beta$ -glucosidases are biologically active enzymes present in the living organisms. They have an important role for obtaining energy and can participate in synthesis and breakdown reactions of oligosaccharides. They are of interest for biotechnology because they are associated with the release of volatile and aromatic molecules, and can be used to enrich food and beverages. Little is known about  $\beta$ -glucosidases in human saliva and its relation to oral conditions. Previous studies indicate the presence of these enzymes in the saliva of patients with periodontal diseases, while others suggest that these enzymes may be associated with a differentiated perception of the palate. In this context, this study aimed to determine the activity of  $\beta$ -glucosidases in human saliva and its relationship with the presence of dental biofilm, halitosis and the possible action of xylitol on these enzymes. For that, salivary samples of 48 volunteers (selected and properly oriented) were analyzed by enzymatic assays with the chromogenic substrate p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) to determine the activity of  $\beta$ -glucosidases enzymes in this body fluid. The possible action of xylitol on the enzyme was investigated by pNPG assays in the absence and presence of xylitol. The data were related to clinical conditions observed in the individual dental examination. The results indicate that salivary  $\beta$ -glucosidases have bacterial origin and that patients with dental biofilm accumulation and halitosis present higher  $\beta$ -glucosidase activity. In addition, gas chromatographic analyzes showed the ability of exogenous  $\beta$ -glucosidases enzymes (from *Bacillus polymyxa*) to modify the aromatic profile of saliva samples, suggesting that the presence of these enzymes may favor the release of volatile aromatic compounds and be one of the factors associated with oral halitosis. Xylitol appears to inhibit the enzyme in a noncompetitive manner, so we suggest that inhibition over  $\beta$ -glucosidases may be one of the explanations for the already known non-stick action of xylitol.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase. Saliva. Halitosis. Biofilm. Xylitol.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplo de hidrólise realizada por enzimas $\beta$ -glicosidasas.....	23
Figura 2 - Exemplo da formação de $\beta$ -glicosídeos por $\beta$ -glicosidasas de amêndoas doce em condições definidas.....	24
Figura 3 - $\beta$ -glicosídeos sintetizados por $\beta$ -glicosidasas de amêndoas doce em condições definidas II.....	24
Figura 4 - Atividade $\beta$ -glicosidásica na saliva e condições bucais .....	49
Figura 5 - Gráfico de Michaelis-Menten e parâmetros cinéticos de $\beta$ -glicosidasas presentes em amostras de saliva humana.....	49
Figura 6 - Relação entre atividade $\beta$ -glicosidásica na saliva e condições bucais.....	50
Figura 7 - Alteração do perfil volátil de amostra de saliva humana após a adição de $\beta$ -glicosidasas exógenas.....	51
Figura 8 - Inibição de $\beta$ -glicosidasas presentes na saliva humana por xilitol.....	62
Figura 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk. Inibição não competitiva do xilitol sobre $\beta$ -glicosidasas presentes na saliva humana.....	63



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Causas da halitose e compostos voláteis relacionados.....	35
Tabela 2 - Compostos voláteis, sulfurados e orgânicos, associados a halitose.....	36
Tabela 3 - Compostos voláteis liberados após ação de $\beta$ -glicosidases exógenas em amostras de saliva humana.....	52
Tabela 4 - Atividade $\beta$ -glicosidásica na saliva humana e sua relação com a presença de biofilme dental.....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS

pH	Potencial hidrogeniônico
pNPG	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo
mM	Milimolar
Ki	Constante de inibição
$\mu$ L	Microlitro
M	Molar
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
g	Gramma
min	Minuto
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
TO	Teste Organoléptico
RPM	Rotações por minuto (centrifugação)
GC-MS	Gas chromatography - Mass spectrometry
mL	Mililitro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
LB	Meio de cultura Luria Bertani
Km	Constante de Mikaelis Menten
Vmax	Velocidade máxima
U/mL	Unidade de atividade enzimática por mililitro



## LISTA DE SÍMBOLOS

-OH	Grupamento hidroxila
%	Porcentagem
C	Carbono
N	Nitrogênio
Na <sup>+</sup>	Sódio
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
K <sup>+</sup>	Potássio
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ânion bicarbonato
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Fosfato de Dihidrogênio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
<	Menor



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
2.1	$\beta$ -GLICOSIDASES .....	23
<b>2.1.1</b>	<b>Funções e aplicações das <math>\beta</math>-glicosidases endógenas e exógenas</b> .....	<b>25</b>
2.1.1.1	<i><math>\beta</math>-glicosidases e o enriquecimento aromático</i> .....	27
2.2	SALIVA HUMANA.....	28
<b>2.2.1</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidases na saliva humana</b> .....	<b>29</b>
2.2.1.1	<i>Coleta de saliva</i> .....	30
2.3	MICROBIOTA ORAL.....	31
2.4	BIOFILME DENTAL .....	32
2.5	HALITOSE.....	34
<b>2.5.1</b>	<b>Métodos para determinação da Halitose</b> .....	<b>37</b>
2.6	XILITOL .....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
<b>3.1.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>CAPITULO I – MANUSCRITO I</b> .....	<b>43</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	44
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
<b>4.2.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Seleção de voluntários e coleta de saliva</b> .....	<b>45</b>
4.2.2.1	<i>Exame clínico Odontológico</i> .....	46
<b>4.2.3</b>	<b>Determinação da atividade <math>\beta</math>-glicosidásica</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Identificação de microrganismos</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Análise de amostras por Cromatografia Gasosa e Espectrômetro de Massa</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>47</b>
4.3	RESULTADOS .....	48
<b>4.3.1</b>	<b>Atividade <math>\beta</math>-glicosidásica</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Perfil de compostos voláteis orgânicos na saliva após adição de <math>\beta</math>-glicosidases</b> ...	<b>51</b>
4.4	DISCUSSÃO / CONCLUSÃO .....	52
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II – MANUSCRITO II</b> .....	<b>57</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	58
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
<b>5.2.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>59</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Seleção de voluntários e coleta de saliva</b> .....	<b>59</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Ensaio enzimáticos</b> .....	<b>59</b>

5.2.3.1 Inibição da atividade $\beta$ -glicosidásica por xilitol .....	60
<b>5.2.5 Análises estatísticas .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

$\beta$ -glicosidases são enzimas glicosídicas biologicamente ativas presentes em todos os reinos vivos. Estão associadas a diversas funções e vias metabólicas, tendo papel importante para obtenção energética, liberação de moléculas de interesse e síntese de carboidratos, desempenhando funções de hidrólise, hidrólise reversa e transglicosilação (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010; BATHIA et al., 2002). A quebra de ligações  $\beta$ -glicosídicas de oligossacarídeos e glicosídeos estão entre suas principais funções catalíticas conferindo a estas enzimas aplicações industriais e agronômicas. Em extratos vegetais, a atividade destas enzimas está associada à liberação de perfumes e compostos tóxicos relacionados à proteção (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010), já em microrganismos parecem desempenhar função importante para obtenção energética (KRISCH et al., 2010). Sabe-se que o tratamento de alimentos e bebidas, especialmente provenientes de extratos vegetais, com  $\beta$ -glicosidases produzidas por bactérias, fungos ou leveduras, desempenha significativa mudança e melhora no perfil aromático dos mesmos a partir da liberação de terpenos, compostos fenólicos e álcoois cíclicos associados a hidrólise de precursores de aroma em forma de  $\beta$ -glicosídeos (GUEGUEN et al., 1997; WANG et al., 2013; KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010; BATHIA et al., 2002). Existe evidência de que a saliva humana possa estar envolvida com a liberação ou retenção de compostos aromáticos provenientes da dieta, sendo que a diluição destes compostos, hidrólise de precursores aromáticos e retenção de moléculas odoríferas à proteínas salivares são fatores que podem alterar a percepção do aroma pelo sistema olfativo (PLOYON; MORZEL; CANON, 2017). De acordo com Muñoz-Gonzalez et al. (2015) a microbiota oral pode modificar características aromáticas de extratos vegetais, sugerindo que bactérias residentes ou presentes no biofilme dental são capazes de liberar compostos aromáticos a partir da hidrólise de precursores de aroma em forma de glicosídeos.

A cavidade bucal é formada por diferentes superfícies cobertas por uma gama de bactérias organizadas em biofilmes que frequentemente estão associadas a doenças bucais (AAS et al., 2005; GIBBONS, 1989; MARSH e ZAURA 2017). A placa, ou biofilme dental, é uma das comunidades microbianas mais complexas do corpo humano, sendo extensamente estudada e definida como um conjunto diversificado de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular, aderidos a componentes orais. As bactérias presentes na placa dental interagem entre si de forma que o biofilme pode ser entendido como uma comunidade microbiana coordenada, organizada e metabolicamente integrada. (GIBBONS e HOUTE, 1975; HOUTE, 1982; MARSH, 2004; MARSH e ZAURA 2017). Enzimas bacterianas, como

glicosiltransferases e glicosilhidrolases, desempenham um papel importante na adaptação e sobrevivência de tais microrganismos, atuando na quebra e síntese de carboidratos variados (INUI et al., 2015).  $\beta$ -glicosidases já foram encontradas em fluidos provenientes da cavidade bucal porém, sua origem específica ainda não é totalmente conhecida, sendo associada inicialmente a condições bucais patológicas como gengivite e periodontite (SODERLING et al., 1987). Estudos de expressão gênica de *Streptococcus gordinii*, um dos microrganismos pioneiros na formação da placa dental, demonstraram que enzimas glicosídicas, como as  $\beta$ -glicosidases, são essenciais para a formação do biofilme bacteriano (KILIC et al., 2004). Além disso, a atividade de  $\beta$ -galactosidases, produzidas por bactérias orais, já foi relacionada a produção de compostos voláteis associados a halitose a partir da desglicosilação e proteólise de glicoproteínas salivares, podendo esse ser um passo inicial para a produção do mau odor bucal. Entretanto, o estudo destas enzimas por si só não é suficiente para determinar o papel de glicosidases na produção de compostos voláteis na cavidade bucal (SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012; AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002). A halitose é uma queixa muito comum entre os pacientes que procuram tratamento odontológico e apesar de ser multifatorial, está em sua maior parte, associada à cavidade bucal (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002).

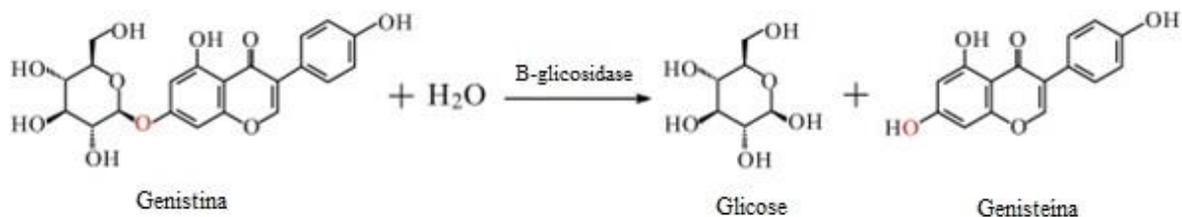
Substâncias capazes de controlar microrganismos orais e interferir na adesão bacteriana às superfícies bucais são de grande importância para o controle do biofilme, prevenção de doenças, manutenção da saúde bucal e bem estar. O xilitol, um açúcar sintético usado como substituto da sacarose, apresenta muitas aplicações clínicas e suas principais propriedades consistem em efeitos anticariogênicos e antiaderentes, reduzindo a adesão de bactérias importantes para a formação de biofilme (ABDUL RAZAK et al., 2017; ARCAÑO et al., 2018; JANAKIRAM; DEEPAN KUMAR; JOSEPH, 2017; SODERLING et al., 1987). Vários estudos demonstraram que este açúcar sintético age na diminuição da formação do biofilme dental (SODERLING et al., 1987; SODERLING e HIETALA-LENKKERI, 2010), no entanto, o seu modo exato de ação antiaderente ainda não é completamente compreendido. Neste contexto, este estudo buscou determinar a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana, sua possível relação com o biofilme dental e liberação de compostos voláteis que podem estar associados à halitose, bem como a ação do xilitol sobre estas enzimas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 $\beta$ -GLICOSIDASES

$\beta$ -glicosidases constituem um grupo de enzimas glicosídicas biologicamente importantes que estão presentes em todos os reinos vivos, desde microrganismos até mamíferos e desempenham funções variadas ao catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010). Em condições fisiológicas essa reação resulta no rompimento de ligações  $\beta$ -glicosídicas formadas entre o grupo hemiacetal- OH de uma aldose ou glicose cíclica e o grupo -OH de outro composto (BATHIA et al., 2002), levando a quebra de oligossacarídeos e glicosídeos com a consequente liberação de resíduos de glicose e agliconas (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010) (ver Figura 1). Em condições definidas, reações de hidrólise reversa ou transglicosilação podem ser catalisadas por estas enzimas, gerando produtos alongados provenientes da ligação de resíduos glicídicos a diferentes moléculas como oligossacarídeos e álcoois (BATHIA et al., 2002) (ver Figuras 2 e 3). Segundo Crout e Vic (1998) a incubação de doadores de glicose (monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicosídeos) com  $\beta$ -glicosidases permite a formação do intermediário glicosil- $\beta$ -glicosidase que pode ser interceptado por água gerando produtos da hidrólise ou por um aceptor de glicose, permitindo a formação de um novo glicosídeo ou polissacarídeo. Esta ação dupla das  $\beta$ -glicosidases é fundamental em muitas vias biológicas importantes como sinalização celular, biossíntese e degradação de polissacarídeos estruturais e de reserva e interações patógeno-hospedeiro, além disso, podem desempenhar funções importantes na área da biotecnologia (BATHIA et al., 2002).

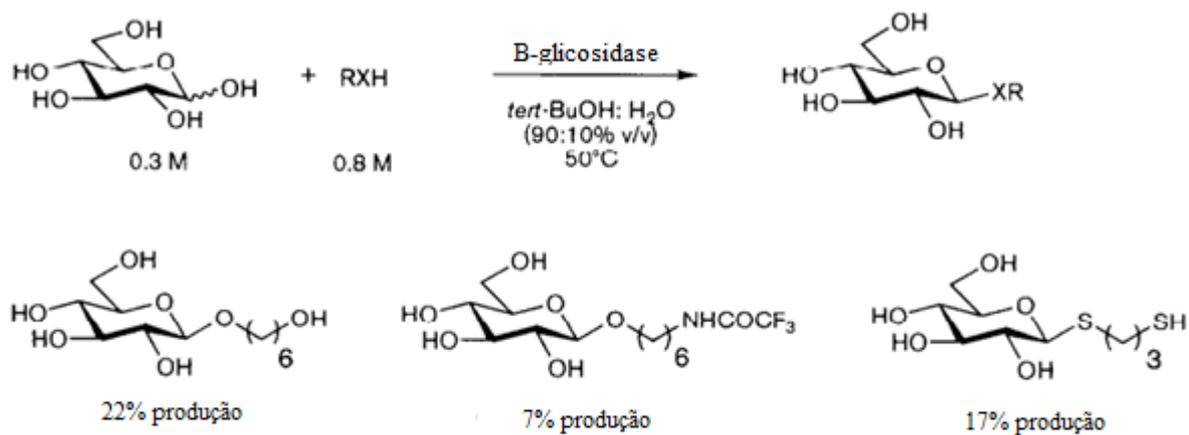
Figura 1 - Exemplo de hidrólise realizada por enzimas  $\beta$ -glicosidases



Fonte: Adaptado de PEI et al., 2016.

Isoflavonas em forma de glicosídeos podem ser hidrolisadas para a liberação de agliconas fenólicas e glicose.

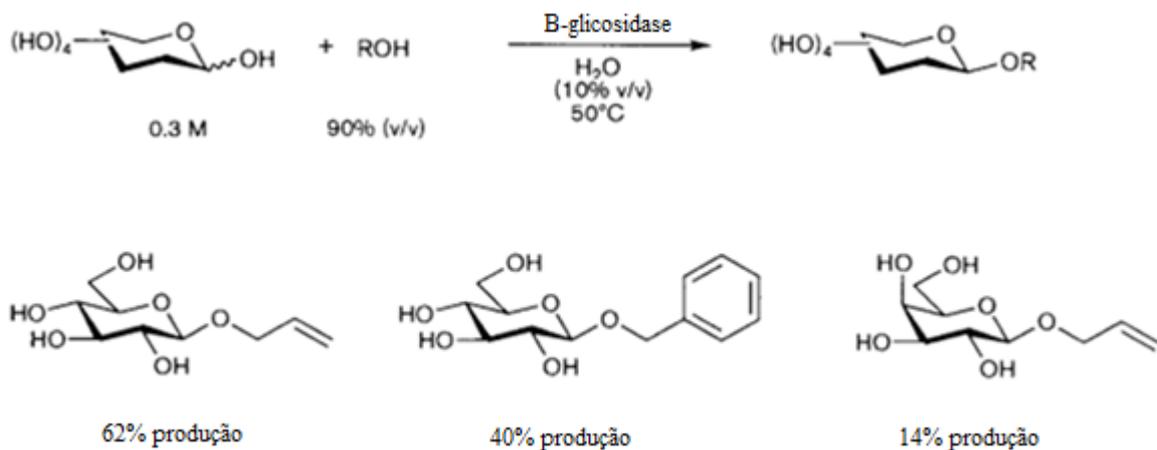
Figura 2 - Exemplo da formação de  $\beta$ -glicosídeos por  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce em condições definidas



Fonte: Adaptado de CROUT e VIC, 1998.

Formação de uma variedade de  $\beta$ -glicosídeos a partir da ação de síntese de  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce em meio contendo proporções de altas concentrações de solventes orgânicos e 10 a 20% de água.

Figura 3 -  $\beta$ -glicosídeos sintetizados por  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce em condições definidas II



Fonte: Adaptado de CROUT e VIC, 1998.

Formação de glicosídeos sintetizados utilizando  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce em reação contendo mistura de hexose, álcool (90%) e água (10%). O álcool atua como solvente e aceptor glicídico.

### 2.1.1 Funções e aplicações das $\beta$ -glicosidases endógenas e exógenas

As  $\beta$ -glicosidases intrínsecas aos organismos desempenham funções importantes para proteção e perpetuação da espécie. Enzimas presentes em plantas parecem ter diversas ações e estão associadas a liberação de toxinas e perfumes. Plantas possuem glicosídeos formados por compostos tóxicos que quando hidrolisados por  $\beta$ -glicosidases atuam para defesa, além disso, a parede celular destes organismos é rica em carboidratos que quando clivados se tornam excelentes fontes de carbono (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010). Uma variedade de alimentos como maçãs, uvas, sucos de frutas e vinho contêm frações livres de terpenos voláteis e uma grande quantidade de precursores aromáticos em forma de glicosídeos não voláteis (ROMO-SÁNCHEZ et al., 2014; MATEO e MAICAS, 2005). Estes glicosídeos são formados pela ligação de um açúcar a uma outra molécula, chamada aglicona, que é composta na maioria dos casos por terpenos, porém, álcoois cíclicos e lineares, álcool benzênico, norisoprenóides, ácidos fenólicos e fenóis voláteis também podem compor essa porção (MATEO e MAICAS, 2005). O potencial aromático das uvas, por exemplo, é revelado durante a maturação a partir da ação de  $\beta$ -glicosidases endógenas, porém, essas enzimas apresentam baixa atividade e não são capazes de liberar parte dos compostos voláteis, não explorando o perfil aromático total da fruta (GUEGUEN et al., 1997).  $\beta$ -glicosidases exógenas podem ser utilizadas para a liberação de terpenos, compostos fenólicos e álcoois cíclicos aumentando a qualidade aromática de bebidas e extratos vegetais (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010; BATHIA et al., 2002).

Muita atenção tem sido dada ao enriquecimento de alimentos e bebidas pela hidrólise de precursores aromáticos utilizando enzimas glicosídicas, especialmente as  $\beta$ -glicosidases (WANG et al., 2013). Além disso, a hidrólise enzimática de isoflavonoides e flavonoides que se apresentam em forma de glicosídeos e estão presentes em frutas, vegetais e grãos gera produtos biologicamente ativos com uso na medicina e indústria alimentícia, sendo que alimentos, bebidas e sementes podem ser melhorados nutricionalmente pela liberação de vitaminas, antioxidantes e outros compostos benéficos (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010). A soja, por exemplo, é rica em isoflavonas em forma de glicosídeos e seus efeitos farmacológicos estão relacionados a agliconas obtidas após hidrólise, especificamente Daidzein e Genistein (PEI et al., 2016).

Em microrganismos como bactérias e fungos,  $\beta$ -glicosidases são importantes para obtenção energética, fazem parte do complexo enzimático das celulases e hidrolisam celobiose e celo-oligossacarídeos para a produção de açúcares fermentáveis, sendo também muito

atraentes para a produção de etanol biocombustível (KRISCH et al., 2010).  $\beta$ -glicosidasas provenientes de leveduras como *Candida molischiana*; fungos como *Aspergillus niger* e bactérias como *Oenococcus oeni* já foram citadas na literatura com potencial ação para melhoramento aromático de vinhos (MATEO e MAICAS, 2005).

A ação sintética das  $\beta$ -glicosidasas (hidrólise reversa ou transglicosilação) pode ser utilizada para síntese de uma variedade de compostos como oligossacarídeos e glicoconjugados (BATHIA et al., 2002). Oligossacarídeos podem atuar como agentes terapêuticos, ferramentas de diagnóstico ou como promotores do crescimento bacteriano, tendo importantes funções nos sistemas biológicos de fertilização, embriogênese e proliferação celular (KRISCH et al., 2010), além de possuírem potencial para o desenvolvimento de agroquímicos e drogas (KEERTI et al., 2014).

Muitos microrganismos tem a capacidade de sintetizar, a partir de características gênicas (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015), substâncias poliméricas extracelulares que são compostas por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que contribuem para propriedades adesivas dos organismos e para a estrutura dos biofilmes. Biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos envoltos em uma matriz polimérica que pode ser sítio para a ação de variadas enzimas (ROMANI et al., 2008), entre elas, as  $\beta$ -glicosidasas que estão envolvidas principalmente na decomposição de polissacarídeos simples em substratos energéticos (glucose) e que são expressas por uma grande parte dos organismos presentes no biofilme bacteriano (PETER et al., 2011). De acordo com Romani et al. (2008), que analisaram o processo de formação do biofilme natural aquático durante a colonização de uma superfície artificial, existem mudanças na composição do mesmo de acordo com sua fase de desenvolvimento, sendo, por exemplo, que a quantidade de polissacarídeos, C e N e a atividade de enzimas se altera durante o amadurecimento do biofilme. Os dados dos autores indicam que enzimas como leu-aminopeptidases e  $\beta$ -glicosidasas se apresentam em altas concentrações em biofilmes jovens (1-4 dias de formação), bem como a quantidade de substâncias poliméricas extracelulares, e que diminuem consideravelmente a medida que o biofilme amadurece, podendo essa maior proporção no biofilme jovem estar relacionada ao processo de fixação celular.

### 2.1.1.1 $\beta$ -glicosidases e o enriquecimento aromático

Durante o processo de fabricação de vinhos a adição de enzimas  $\beta$ -glicosidases vem sendo considerada de interesse industrial para a hidrólise enzimática de precursores aromáticos (WANG et al., 2013). Muitas enzimas, de variadas origens têm sido investigadas e comparadas a  $\beta$ -glicosidases comerciais com o objetivo de se encontrar glicosidases eficientes, resistentes a glicose e que possam ser utilizadas em processos industriais que exigem muitas vezes alterações de pH ou fases que podem interferir ou inibir a ação destas enzimas. Gueguen et al. (1997) realizaram ensaios para avaliar a hidrólise de precursores aromáticos no vinho Muscat a partir de  $\beta$ -glicosidases isoladas de *Candida molischiana*. A análise do vinho tratado com a enzima mostrou um aumento na concentração de monoterpenos livres e álcoois cíclicos sugerindo que a adição dessas enzimas durante o processo de produção do vinho pode ajudar a aumentar a qualidade aromática e de sabor do mesmo. Wang et al. (2013) analisaram a ação de duas  $\beta$ -glicosidases diferentes produzidas pela levedura *Trichosporon asahii* sobre compostos presentes na uva e no vinho Cabernet Gernischt comparadas a uma enzima comercial. Os resultados sugeriram que ambas enzimas possuem a capacidade de melhorar o perfil aromático do extrato vegetal e do vinho por meio da liberação de compostos aromáticos anteriormente não voláteis. As enzimas utilizadas neste estudo, apesar da mesma origem, possuíam atividades de hidrólise diferentes sendo cada uma delas mais eficiente para uso no extrato vegetal ou durante o processamento do vinho. Su et al. (2010) compararam a ação de  $\beta$ -glicosidases comerciais, após duas técnicas diferentes de imobilização, com enzimas livres sobre o chá verde, chá preto e chá *oolang*. Os resultados mostraram que as enzimas imobilizadas são mais estáveis, podem ser reutilizadas, são facilmente controladas, mais favoráveis economicamente e possuem maior afinidade pelo substrato em relação às enzimas livres, além disso, podem ser utilizadas para o enriquecimento aromático de bebidas como o chá, já que após o tratamento com as enzimas houve aumento significativo na concentração total de óleos essenciais, indicando que precursores aromáticos em forma de glicosídeos presentes nestas bebidas podem ser hidrolisados de forma eficaz pela enzima.

A aromatização de vinhos e outras bebidas é de grande interesse para a indústria alimentícia e comercialização destes produtos, portanto, é crescente o empenho para o enriquecimento dos mesmos. Alguns estudos demonstram que a saliva humana pode exercer papel importante na liberação de aromas através de variadas propriedades físico-químicas, desde a diluição de substâncias aromáticas, alterações de pH e hidratação dos alimentos bem como interações com sais e proteínas e liberação de precursores aromáticos, porém, os

resultados dos poucos estudos a respeito da ação da saliva sobre a liberação de aromas em vinhos ainda são contraditórios (MUÑOZ-GONZALEZ et al., 2014). Além da composição da matriz vínica ou das características físico-químicas dos compostos aromáticos, outros fatores que podem afetar o aroma estão ligados a parâmetros fisiológicos humanos como a microbiota oral e pouco se sabe sobre sua capacidade de transformação de glicosídeos precursores de aroma em agliconas odoríferas. Muñoz-Gonzalez et al. (2015) realizaram ensaios para determinação da possível ação de bactérias orais residentes (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*), presentes no biofilme dental (*Streptococcus mutans*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*) e possivelmente presentes na cavidade bucal (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) sobre glicosídeos precursores de aroma isolados de uvas brancas. Todas as bactérias investigadas foram capazes de hidrolisar os glicosídeos liberando diferentes tipos de agliconas (terpenos, derivados benzênicos e álcoois), além de mostrarem atividade  $\beta$ -glicosidásica quando incubadas com O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo levando a liberação da aglicona volátil (1-octanol). Quando os ensaios foram realizados utilizando saliva humana, as agliconas odoríferas só foram produzidas durante a incubação do extrato vegetal com a microbiota oral isolada de saliva fresca, não havendo liberação de odor quando o extrato foi incubado com saliva após processos de centrifugação, desta forma, Muñoz-Gonzalez et al. (2015) sugeriram que a microbiota oral tem a capacidade de liberar compostos aromáticos a partir de estruturas glicosídicas.

## 2.2 SALIVA HUMANA

A saliva humana é uma solução composta por água, compostos orgânicos e inorgânicos, fluído do sulco gengival e restos celulares da mucosa oral (ZHANG et al., 2016), podendo conter também sangue e resíduos alimentares provenientes da dieta (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). Este fluído corporal é secretado por glândulas salivares maiores e menores e possui variadas funções (ZHANG et al., 2016), dentre elas a cobertura e lubrificação de mucosas e dentes, remineralização dental, atividade imunológica e protetiva além de ser imprescindível para a formação do bolo alimentar, interferindo também no paladar (SCHENKELS et al., 1995). Na composição complexa da saliva, que está associada a sua diversidade de funções, estão: ureia, amônia, ácido úrico, colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos, glicolipídeos, enzimas, glicoproteínas, aminoácidos, hormônios esteroides e altas concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (ZHANG et al., 2016). O interesse por pesquisas com a saliva

humana cresceu após a descoberta de que parte dos muitos componentes que fazem parte deste fluído podem servir como biomarcadores para o diagnóstico de doenças sistêmicas ou como sinais do estado de saúde bucal ou geral de um indivíduo (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). Existe evidencia de que a saliva humana possa estar envolvida com a liberação de compostos odoríferos (ésteres, aldeídos, terpenos, entre outros), que podem ser provenientes da dieta e que são liberados por meio da ação de enzimas presentes na saliva, podendo ser esta uma explicação para a persistência de moléculas aromáticas após o consumo de determinados alimentos (BUETTNER, 2002). Muitas proteínas salivares são enzimas que catalisam reações que podem envolver compostos aromáticos dependendo de sua estrutura química. Enzimas presentes na saliva responsáveis por reações de conversão de aromas podem ser originadas das glândulas salivares, tecidos orais e microbiota (PLOYON; MORZEL; CANON, 2017). Alguns estudos apontam a capacidade de degradação enzimática de compostos aromáticos pela saliva, sendo que por meio de diferentes fenômenos que ocorrem na cavidade bucal a liberação de compostos aromáticos pode ser afetada. Estes fenômenos podem ser resumidos na retenção de aromas pela ligação dos mesmos às mucinas, levando a uma menor percepção aromática, e a conversão enzimática de moléculas odoríferas ou não em novas moléculas odoríferas, reduzindo a concentração de precursores aromáticos. A ação da saliva sobre a liberação e a percepção do aroma é complexa e não pode ser explicada por um único efeito (PLOYON; MORZEL; CANON, 2017).

### **2.2.1 $\beta$ -glicosidases na saliva humana**

Diversas enzimas presentes na saliva podem ser produzidas por células das glândulas salivares, microrganismos, leucócitos e restos de células epiteliais. A literatura sugere que em comparação a pacientes saudáveis, maiores concentrações enzimáticas são encontradas na saliva de pacientes com doenças periodontais e isso se deve a contribuição de bactérias, células inflamatórias e a destruição tecidual associada a essas doenças (KAUFMAN e LAMSTER, 2000). Nakamura e Slots (1983) avaliaram a atividade enzimática na saliva e a relação com a saúde periodontal por meio de ensaios com amostras de saliva de pacientes saudáveis e com periodontite. Os resultados mostraram que maiores atividades de esterases,  $\beta$ -glucuronidases,  $\beta$  e  $\alpha$  glicosidases e aminopeptidases foram encontradas na saliva de pacientes periodontalmente comprometidos. Dois anos mais tarde, ZAMBON et al. (1985) determinaram a redução destas enzimas na saliva de pacientes após o tratamento periodontal, em conjunto com a redução de bactérias patogênicas, sugerindo que a atividade enzimática está principalmente relacionada a

microrganismos. Muitas pesquisas analisam a presença de enzimas na saliva humana, incluindo as  $\beta$ -glicosidases, e sua relação com o diagnóstico e tratamento de doenças. Stradwick et al. (2017) otimizaram e validaram um método para quantificar, por meio do espectrofotômetro, a atividade e a prevalência de  $\beta$ -glicosidases neste fluido corporal utilizando o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG), tampão fosfato pH 6,5,  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce e  $\alpha$ -Ciclodextrina para aumentar a sensibilidade dos ensaios. O método foi aplicado para determinação da atividade enzimática em amostras de saliva fresca, após centrifugação, de 20 voluntários saudáveis e livres de alterações bucais. Os resultados mostraram que 19 das 20 amostras apresentaram alguma atividade, com grandes variações individuais, sendo que apenas 4 amostras mostraram valores relativamente altos e significativos, estando de acordo com estudos anteriores, citados pelos autores, que apontam que a incidência de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana seria de cerca de 20%. A variação na atividade destas enzimas na saliva poderia representar, hipoteticamente, diferenças de percepção individual do paladar. Walle et al. (2005), analisaram a hidrólise de flavonoides glicosídicos na cavidade bucal e sugeriram que a produção de agliconas como a genisteína é proveniente da hidrólise destes glicosídeos por  $\beta$ -glicosidases, porém, a fonte destas enzimas na cavidade bucal não é clara, sendo que podem ser provenientes da microbiota bucal e de células epiteliais, além disso, a hidrólise destes flavonoides difere de indivíduo para indivíduo.

#### *2.2.1.1 Coleta de saliva*

O fluxo e a composição da saliva podem ser essenciais para muitos protocolos clínicos e científicos (NAVAZESH, 1993). O uso deste fluido corporal como material de pesquisa está associado a algumas dificuldades técnicas devido as suas complexas propriedades químicas e bioquímicas (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). A quantidade e a composição salivar dependem de muitos fatores individuais, como o funcionamento e tamanho das glândulas salivares, dieta, idade, gênero, condição de saúde, ritmo circadiano e uso de medicamentos, portanto, quando a saliva é utilizada como material de pesquisa, é importante a padronização de sua coleta (NAVAZESH, 1993; SCHIPPE et al., 2007). A saliva pode ser coletada em repouso ou por meio de estimulação, sendo estimulada por uma variedade de agentes para estímulo gustativo como o ácido cítrico, ou estímulo mecânico como parafina, borrachas e gomas de mascar. A estimulação da saliva é utilizada com frequência pois aumenta o fluxo salivar e permite a coleta de maior volume. Quando a saliva é coletada de forma estimulada, a duração da estimulação e

a natureza do estimulante podem alterar o fluxo e a composição salivar, devendo estes processos serem padronizados (NAVAZESH, 1993). A estimulação mecânica (mastigatória) não interfere na composição da saliva e pode ser realizada da seguinte forma (NAVAZESH, 1993):

- Cada indivíduo deve ser orientado a não fumar, comer ou beber por 1-2 horas antes da sessão de coleta;
- Utilizar base de goma, parafina ou borracha em tamanho padrão para mastigação;
- Iniciar o processo de coleta de saliva após a padronização da mastigação e do fluxo salivar (1 a 2 minutos de estimulação em que a saliva produzida é descartada);
- Estimulação (mastigação) durante 5 minutos, em que toda a saliva produzida é cuspidada e armazenada para estudo.

### 2.3 MICROBIOTA ORAL

Desde a década de 70 sabe-se que é grande a variabilidade de microrganismos presentes na cavidade bucal (SOCRANSKY e MANGANIELLO, 1971) e muito ainda precisa ser entendido sobre sua microbiota residente. Aas et al. (2005) investigaram a microbiota bacteriana presente na cavidade bucal de indivíduos saudáveis por meio da identificação de bactérias presentes em diferentes sítios orais (dentes, tecidos moles e placa dental). Mais de 140 bactérias pertencentes a 6 diferentes filos foram identificadas e dentre elas se destacam os *Streptococcus*, *Veionella*, *Actinomyces*, *Neisseria* e bactérias ainda não cultivadas anteriormente (que se apresentam em grande quantidade). O ambiente bucal permite o crescimento de diversas comunidades de microrganismos como vírus, micoplasmas, bactérias, Archaea, fungos e protozoários (MARSH e ZAURA, 2017). Estes microrganismos persistem na cavidade bucal organizados em biofilmes compostos por diversas espécies, formando a microbiota oral residente, que normalmente está em harmonia com o hospedeiro e é importante para a saúde bucal e sistêmica (MARSH e ZAURA, 2017). É interessante considerar que algumas bactérias requerem a presença dos dentes para colonizar a cavidade bucal (*S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis*) estando ausentes antes da erupção dental e após exodontia de todos os dentes (GIBBONS, 1989). O processo de erupção dental está entre os fatores que podem afetar a composição da microbiota bucal por fornecer novas superfícies a serem colonizadas (BOWEN et al, 2017). Além disso, a maioria das bactérias tem predileção por sítios específicos, sendo que aquelas presentes no dorso lingual não são as mesmas encontradas nas superfícies dentais (AAS et al., 2005; SOCRANSKY e MANGANIELLO, 1971). O maior

acúmulo de bactérias é encontrado nas superfícies dos dentes e no dorso da língua e a composição da microbiota é influenciada pelo ambiente oral, sendo que mudanças nas condições bucais podem afetar as interações entre os microrganismos e determinar uma relação prejudicial entre microbiota e o hospedeiro, aumentando o risco a doenças como cáries ou gengivite e periodontite (GIBBONS e HOUTE, 1975; AAS et al., 2005; MARSH e ZAURA, 2017). Condições que podem interferir na comunidade microbiana presente na cavidade bucal são: idade, dieta, higiene, condições sistêmicas e imunológicas e uso de medicamentos (BOWEN et al, 2017). Para que os microrganismos possam colonizar, crescer e sobreviver no meio bucal, eles precisam se aderir aos sítios orais persistindo localmente apesar das forças associadas à deglutição (MARSH e ZAURA, 2017).

#### 2.4 BIOFILME DENTAL

A placa dental tem sido estudada extensivamente por causa de sua relação com doenças orais como cárie, gengivite e periodontite (GIBBONS e HOUTE, 1975; HOUTE, 1982; MARSH e ZAURA, 2017). É uma das mais complexas comunidades microbianas no corpo humano, podendo ser definida como um diverso conjunto de microrganismos presente sobre a superfície dos dentes, em forma de biofilme, embebida em uma matriz extracelular de polímeros de origem bacteriana e do hospedeiro (GIBBONS e HOUTE, 1975). Interposta entre a superfície do esmalte e a placa bacteriana está uma fina camada amorfa denominada película adquirida que é formada principalmente de constituintes salivares e que tem importância para lubrificação e hidratação de tecidos duros e moles. É a partir da adesão de microrganismos a esta película que ocorre a formação, acúmulo e amadurecimento do biofilme dental especialmente em locais que oferecem proteção contra as forças de remoção presentes na cavidade bucal (MARSH, 2004). Os colonizadores iniciais predominantes das superfícies dentais são cocos e bastonetes anaeróbios facultativos Gram positivos, incluindo espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces* (KRIEBEL et al, 2018). Após a fixação inicial dos colonizadores primários, uma massa de biofilme se desenvolve através do crescimento contínuo e subsequente adsorção de outras espécies bacterianas por meio da coagregação (KRIEBEL et al, 2018). De fato, o ciclo de vida clássico do biofilme inclui a fixação bacteriana, crescimento e amadurecimento do biofilme e por fim sua dispersão (KUANG; CHEN; XU, 2018), portanto, medidas que podem interferir em qualquer estágio do ciclo do biofilme são consideradas uma abordagem para o controle do mesmo (KUANG; CHEN; XU, 2018).

A composição bacteriana da placa é influenciada por muitos fatores do hospedeiro e da dieta que interferem na aderência e no crescimento bacteriano sendo que placas de diferentes indivíduos, em diferentes dentes de um mesmo indivíduo ou em diferentes faces de um mesmo dente apresentam amplas variações em relação a sua composição bacteriana (HOUTE, 1982). A adesão bacteriana é pré-requisito e determinante crítico para a colonização de bactérias nos dentes ou superfícies epiteliais e para a extensão da placa. Tendo em vista as forças de limpeza oral, apenas microrganismos com capacidade suficiente de aderência às superfícies orais são capazes de persistir ou se acumular (HOUTE, 1982; MARSH e ZAURA, 2017). A maioria das bactérias tem a capacidade de formar biofilme por uma matriz auto sintetizada que mantém células unidas e permite a retenção dos microrganismos à superfície colonizada (YAMANAKA et al., 2012).

Os polissacarídeos são um dos principais componentes da matriz da maioria dos biofilmes bacterianos que também é composta em grande parte por proteínas e DNA (YAMANAKA et al., 2012; FUQUA et al., 2019). Desempenham papel essencial para a formação do biofilme, auxiliando na adesão às superfícies, constituição de estruturas complexas e promovendo interações microbianas. Essas moléculas sintetizadas por células bacterianas variam muito em sua composição e, portanto, em suas propriedades químicas e físicas. Os habitantes do biofilme precisam ser protegidos do meio ambiente (células hospedeiras, antimicrobianas, fagocitárias, variações de temperatura, etc.), mantendo o acesso a nutrientes e a capacidade de responder a mudanças locais (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015). Vários polissacarídeos são sintetizados para suprir essas necessidades de maneiras diferentes, auxiliando na adesão bacteriana a uma infinidade de superfícies e fornecendo proteção contra o ataque de antimicrobianos no ambiente, além disso, funcionam como reservatórios para a aquisição de nutrientes e auxiliam na criação de arquiteturas distintas, que potencializam ainda mais um ambiente adequado para a sobrevivência bacteriana (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015; KUANG; CHEN; XU, 2018). Glicoconjugados salivares endógenos tornam-se a fonte de carbono mais significativa para microrganismos orais quando uma fonte exógena de carbono na dieta é escassa. Nestas circunstâncias, enzimas bacterianas como glicosiltransferases e glicosilhidrolases desempenham importante papel na adaptação e sobrevivência dos microrganismos, atuando como enzimas para hidrólise e síntese de carboidratos (INUI et al., 2015).

O *Streptococcus gordonii* é um dos pioneiros na colonização dos dentes humanos, fazendo parte da gama de bactérias que estão associadas à formação da placa bacteriana. Na cavidade bucal este microrganismo não atua de forma patológica, não sendo associado a

doenças bucais, exceto pelo seu envolvimento com o biofilme dental que proporciona ambiente favorável para o desenvolvimento destas alterações. No entanto, tem a capacidade de se aderir e colonizar válvulas cardíacas defeituosas, sendo responsável por muitos casos de endocardite bacteriana (KILIC et al., 2004). Analisando a expressão gênica de *S. gordonii*, foi observado que a regulação de genes associados à metabolização de  $\beta$ -glicosídeos interfere na adesividade bacteriana. Essas bactérias possuem quatro diferentes tipos de  $\beta$ -glicosidases que atuam em sistemas de metabolização de  $\beta$ -glicosídeos. Estes sistemas provavelmente contribuem para a adesão e formação do biofilme bacteriano, sendo responsáveis não apenas pela metabolização de açúcares para fornecimento de fonte de carbono para a sobrevivência, mas também podem estar envolvidos em outros processos como a síntese de glicoproteínas ou polissacarídeos (KILIC et al., 2004).

O biofilme ou placa dental pode ser classificados em biofilme supragengival (localizado sobre os dentes e acima da gengiva) e biofilme subgengival (abaixo da margem gengival) (HOUTE, 1982). Além da diferença de localização, a composição destas duas formas de biofilme dental é distinta. A microbiota da placa bacteriana supragengival é formada por uma variedade de microrganismos e 75% deles predominantemente são *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis*), *Actinomyces* (*A. viscosus* e *A. naeslundii*) e *Veionella*. Outros organismos que podem estar presentes são espécies de *Lactobacillus*, *Neisseria* e *bacterioides*. O biofilme subgengival é composto por colonizadores secundários, mais patogênicos, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (KUBONIWA e LAMONT, 2010). Aproximadamente 50% das bactérias presentes no biofilme dental especialmente o subgengival, ainda não foram cultivadas em laboratório (MARSH, 2004).

## 2.5 HALITOSE

Halitose é um termo utilizado para descrever o odor desagradável que emana da cavidade bucal e que pode ter causas patológicas ou não (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; TONZETICH, 1977). É uma das principais queixas dos pacientes odontológicos e pode estar associada a condições sistêmicas ou locais, sendo considerada uma alteração multifatorial que tem na maioria dos casos origem bucal (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002; SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012). Alterações respiratórias, gastrointestinais, doenças hepáticas e distúrbios nos sistemas hematológico e endócrino podem também ser causa do mau odor bucal (ver Tabela 1) (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013).

Em todos os indivíduos, independentemente da idade, há mau odor bucal após períodos prolongados de jejum ou baixo fluxo salivar, essa condição resulta da atividade metabólica normal na cavidade oral e é acentuada em indivíduos com patologias locais. A halitose fisiológica, como a halitose matinal, tem duração transitória, podendo ser controlada por meio de medidas diárias de higiene bucal (TONZETICH, 1977).

Tabela 1- Causas da halitose e compostos relacionados

CAUSA	COMPOSTOS
Diabetes / Redução de peso	Acetona e outras cetonas.
Alterações renais	Dimetilamina, trimetilamina, amônia.
Alterações hepáticas	Sulfureto de dimetilo, etanotiol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico.
Carcinoma pulmonar	Acetona, 2-butanona, n-propanol, anilina, o-toluidina.
Carcinoma respiratório superior / orofaríngeo	C2-C8 ácidos orgânicos normais e ramificados

Fonte: Adaptado de VAN DEN VELDE et al., 2007.

A má higiene, acúmulo de biofilme dental, saburra lingual, doenças periodontais, cáries e a presença de restos alimentares são os principais fatores locais associados a halitose (TAKEHARA et al., 2010; AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). Mais de 500 espécies bacterianas estão presentes na cavidade bucal e interagem entre si e com os tecidos orais produzindo, muitas vezes, moléculas associadas ao mau odor (SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012). Bactérias degradam aminoácidos como cisteína e metionina em compostos de enxofre voláteis com cheiro desagradável como o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), metilmercaptano ( $CH_3SH$ ) e sulfeto de dimetila ( $CH_3$ ), sendo a degradação bacteriana a maior causa do mau odor bucal (TAKEHARA et al., 2010; BOLLEN e BEIKLER, 2012) por gerar os principais compostos associados a halitose (ver tabela 2) (LARSSON, 1965).

Tabela 2 - Compostos voláteis, sulfurados e orgânicos, associados a halitose

<b>GRUPO / FAMÍLIA</b>	<b>COMPOSTOS</b>
Compostos voláteis sulfurados (VSCS)	Sulfato de hidrogênio; Metil mercaptano; Sulfureto de dimetilo; Dissulfeto de dimetila
Compostos aromáticos voláteis e aminas	Aminas; Indol; Escatol; Piridina; Uréia; Amônia; Metilamina; Dimetilamina; Trimetilamina; Putrescina; Cadaverina
Ácidos graxos de cadeia curta / média ou ácidos orgânicos	Ácido propanóico; Ácido butírico; Ácido acético; Ácido valérico; Ácido isovalérico; Ácido esanóico; Álcoois Metanol, Etanol e Propanol
Compostos alifáticos voláteis	Ciclobutano; Pentano; Aldeídos e cetonas; Acetaldeído; Acetona; Benzofenona; Acetofenona

Fonte: Adaptado de AYLIKCI e ÇOLAK, 2016; VAN DEN VELDE et al., 2007 ; LARSSON, 1965; BOLLEN e BEIKLER, 2012.

Alguns pesquisadores sugerem que glicohidrolases, como  $\beta$ -galactosidases, produzidas por bactérias orais, tem a capacidade de clivar carboidratos de cadeias laterais de glicoproteínas salivares e contribuir para a produção de compostos sulfurados fétidos a partir da decomposição subsequente de aminoácidos (SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012; AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002). Suzuki; Masahiro e Hirofuji (2012) relacionaram a atividade  $\beta$ -galactosidásica na saliva humana a fatores locais já associados a halitose na literatura e a presença do mau odor bucal. Seus dados sugeriram que os níveis de halitose eram maiores no grupo com atividade  $\beta$ -galactosidásica, bem como houve uma relação positiva entre a presença de biofilme supragengival, saburra lingual e a atividade enzimática. A desglicosilação de glicoproteínas salivares pelo metabolismo bacteriano e enzimas glicosidases pode facilitar a proteólise e a produção acelerada de compostos voláteis de enxofre (STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002; TAKEHARA et al., 2010). Uma diferença dramática na formação de mau odor é observada quando um açúcar fermentescível, como a glicose, é adicionado ou omitido na saliva antes de sua incubação. Na ausência de glicose a produção do mau odor é intenso, enquanto que com a sua adição (dependendo da concentração) há menos ou nenhum composto fétido. Como o pH cai abaixo da neutralidade quando o açúcar é adicionado e permanece neutro quando o açúcar é omitido alguns autores sugerem que o pH é uma variável-chave do mau odor (KLEINBERG

e WESTBAY, 1992). Entretanto, de acordo com Sterer, Greenstein e Rosenberg (2002) a presença de glicose pode inibir a produção de compostos fétidos na saliva incubada, havendo menor desglicosilação e produção de compostos sulfurados na presença do açúcar. Segundo os autores, esse efeito não parece resultar de alterações de pH e sim da inibição do processo de desglicosilação, podendo este ser um passo inicial na produção do mau odor bucal.

### **2.5.1 Métodos para determinação da Halitose**

A presença de halitose pode ser determinada clinicamente, dentre outras formas, por meio da análise do hálito do paciente. Na literatura o Teste Organoléptico, a análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa e a mensuração de compostos voláteis sulfurados no hálito por meio de equipamentos portáteis são as formas mais comuns para avaliação do mau odor bucal (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). O Teste Organoléptico é a forma mais antiga de se avaliar o hálito e apesar de ser subjetivo, ainda é considerado padrão ouro para avaliação do mau odor bucal por ter baixo custo, ser prático e simples (BOLLEN e BEIKLER, 2012). Este teste baseia-se na análise olfativa do hálito expirado pela boca a uma distância de aproximadamente 20 cm. A presença e a severidade do mau odor bucal é classificado em uma escala de 0 a 5, em que 0 simboliza a ausência de halitose e 5 halitose severa (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013).

A cromatografia gasosa é utilizada para determinar a presença de compostos voláteis associados a halitose por meio do Cromatógrafo Gasoso e Espectrômetro de Massa. A análise neste caso pode ser realizada a partir do gás presente na cavidade bucal ou de amostras de saliva e saburra lingual (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). Apesar de apresentar grande sensibilidade, esta forma de mensuração do mau odor bucal demanda equipamentos específicos e conhecimento técnico, se tornando, muitas vezes, inviável para pesquisas clínicas. Buscando métodos mais baratos do que a cromatografia gasosa para serem utilizados no consultório odontológico, surgiram os monitores portáteis de compostos sulfurados (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). A sensibilidade e especificidade dos monitores de sulfeto são menores em relação a cromatografia gasosa, porém, seus resultados pode ser considerados significativos. O monitor portátil e as medidas organolépticas mostram baixa correlação devido a compostos voláteis como álcoois, compostos fenólicos, alcenos, cetonas, poliaminas e ácidos graxos que podem ser detectados durante o Teste Organoléptico mas não pelo monitor de sulfeto (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). Pode-se dizer então, que os métodos de análise do mau odor bucal são complementares.

## 2.6 XILITOL

O xilitol é um poliol do tipo pentiol, também chamado de poliálcool ou álcool de açúcar, cuja fórmula molecular é  $C_5H_{12}O_5$  (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano). Tem origem de carboidratos, assim como o sorbitol, e pode ser um adoçante perfeitamente capaz de substituir a sacarose, sendo tolerado por diabéticos e tendo inúmeras aplicações clínicas (MUSSATTO e ROBERTO, 2002; ABDUL RAZAK et al., 2017; ARCAÑO et al., 2018). O uso do xilitol em produtos alimentícios, fármacos e cosméticos já é aprovado internacionalmente. No Brasil podemos encontrar gomas de mascar, doces em geral, adoçantes e produtos de higiene bucal que possuem esse poliálcool em sua composição (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). De acordo com a literatura, uma das principais propriedades do xilitol é sua capacidade anticariogênica pois diferente de açúcares fermentáveis como a sacarose, frutose e glicose, o xilitol não é metabolizado e fermentado por bactérias orais associadas à cárie, especialmente o *Streptococcus mutans*, não havendo, dessa forma, a produção de subprodutos ácidos no biofilme dental que levam à desmineralização dos dentes e o aparecimento de lesões cariosas, além disso, a proliferação desses microrganismos torna-se limitada (MUSSATTO e ROBERTO, 2002; ABDUL RAZAK et al., 2017; ARCAÑO et al., 2018; JANAKIRAM; DEEPAN KUMAR; JOSEPH, 2017). Soderling et al. (1987), compararam os efeitos do sorbitol e do xilitol sobre a agregação e adesividade de *S. mutans* buscando entender os possíveis efeitos destes polióis sobre a formação do biofilme dental. Os autores avaliaram o crescimento e a adesividade dos microrganismos na presença de xilitol e sorbitol em comparação com aqueles submetidos apenas à glicose. Os resultados do estudo sugeriram um pequeno retardo no crescimento bacteriano em meios contendo os polióis e glicose, entretanto, uma redução significativa na adesividade bacteriana à superfície vítrea, especialmente com o uso do xilitol, foi encontrada. De acordo com os autores, a concentração e a solubilidade de polissacarídeos produzidos pelo *S. mutans* foram afetadas tanto na presença do sorbitol como do xilitol, havendo maior produção de polissacarídeos solúveis e redução de insolúveis, podendo esta ser uma explicação para a redução da adesividade célula-célula e célula-vidro observada no estudo e um indício de que esses polióis, especialmente o xilitol, podem interferir no acúmulo da placa bacteriana.

A glicose é essencial para a obtenção energética dos microrganismos e também é decisiva para a produção de polissacarídeos de reserva. Microrganismos associados à formação do biofilme dental (*S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*) utilizam a sacarose obtida a partir da dieta para a produção de polissacarídeos extracelulares. Na ausência ou pequena

concentração de sacarose, os microrganismos utilizam meios estratégicos para economia e obtenção energética como a clivagem de polissacarídeos existentes e a redução na formação dos mesmos. O xilitol e o sorbitol não podem ser utilizados para a geração de energia e também não permitem a produção adequada de polissacarídeos (ABDUL RAZAK et al., 2017). A adesividade de células às superfícies vítreas na presença de sacarose está associada a produção de glicanos insolúveis e a redução na síntese dessas substâncias pode levar a uma diminuição no acúmulo da placa bacteriana. O xilitol parece interferir na adesividade de bactérias do gênero *Streptococcus* formadores de polissacarídeos, assim como o eritritol, e a magnitude da redução na capacidade aderente destes microrganismos não parece estar associada a inibição do crescimento bacteriano (SODERLING e HIETALA-LENKKERI, 2010).

Abdul Razak et al. (2017) avaliaram o efeito de açúcares comerciais alternativos (Stevia, Tropicana Slim, Pal sweet e xilitol) na formação do biofilme de *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, microrganismos que estão presentes nos passos iniciais da formação da placa dental. A sacarose, utilizada no estudo como controle positivo, permitiu a formação de uma densa placa bacteriana em 24 horas de observação e quando este açúcar foi substituído pelo xilitol houve declínio significativo no acúmulo do biofilme. A maior colonização bacteriana ocorreu nas três primeiras horas de observação e na presença dos açúcares alternativos, especialmente o xilitol, houve uma aderência bacteriana mínima, havendo praticamente a inibição da formação da placa neste período.

A inibição de  $\beta$ -glicosidases já foi descrita na literatura estando associada a presença de glicose e alterações de pH. Em muitos casos a glicose, principal produto da hidrólise enzimática, tem forte efeito inibitório sobre estas enzimas. Este é um mecanismo competitivo em que substrato e produto competem pelo sítio ativo (KRISCH et al., 2010). Kelemen e Whelan (1966), descreveram a ação inibitória de polióis, especialmente o eritritol e o xilitol, sobre  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce. A ação inibitória do xilitol sobre enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos, como a  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase já foi descrita na literatura e sugere-se que a redução na ação destas enzimas, encontrada em estudos *in vitro*, possa ser um dos mecanismos por trás das características antidiabéticas relacionadas ao xilitol (CHUKWUMA e ISLAM, 2015).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a relação entre a atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva humana e a liberação de compostos voláteis possivelmente associados à halitose.

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

- Analisar a atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva de pacientes com halitose e comparar com amostras salivares de pacientes sem halitose;
- Avaliar a modificação do perfil aromático de amostras de saliva mediante adição exógena de  $\beta$ -glicosidases provenientes de bactéria, fungo ou vegetal por Cromatografia Gasosa;
- Relacionar a atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva e a presença de quadros clínicos identificados durante o exame Odontológico;
- Determinar a ação do xilitol sobre  $\beta$ -glicosidases presentes nas amostras de saliva.



#### 4 CAPITULO I – MANUSCRITO I

### ESTUDO DA AÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASES EM SALIVA HUMANA E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM HALITOSE

**Lucimari Teixeira<sup>1</sup>, Anderson Albino Gomes<sup>1</sup>, David Miquelutti <sup>2</sup>, Gustavo Felipe da Silva<sup>1</sup> and Maria de Lourdes Borba Magalhães<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Solos e Recursos Naturais, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

#### RESUMO

$\beta$ -glicosidases são enzimas biologicamente ativas presentes em muitos organismos vivos. Possuem papel importante para obtenção energética e podem participar de reações de síntese e quebra de oligossacarídeos. São de interesse para biotecnologia por estarem associadas a liberação de moléculas voláteis e aromáticas, podendo ser utilizadas para enriquecimento de alimentos e bebidas. Pouco se sabe sobre  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e sua relação com condições bucais. Estudos prévios indicam a presença destas enzimas na saliva de pacientes com doenças periodontais, enquanto outros sugerem que estas enzimas podem estar associadas a uma percepção diferenciada do paladar. Neste contexto, este estudo buscou determinar a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva e sua possível relação com a volatilização de compostos aromáticos que podem estar associados à halitose. Os resultados indicam que estas enzimas possuem origem bacteriana e que pacientes com acúmulo de biofilme dental e halitose apresentam maior atividade  $\beta$ -glicosidásica. Além disso, análises por cromatografia gasosa mostraram a capacidade de enzimas  $\beta$ -glicosidases exógenas (provenientes de *bacillus polymyxa*) em modificar o perfil aromático de amostras de saliva, sugerindo que a presença destas enzimas pode favorecer a liberação de compostos voláteis aromáticos e ser um dos fatores associados à halitose de origem bucal.

**Palavras chave:**  $\beta$ -glicosidases. Halitose. Saliva. Biofilme.

## 4.1 INTRODUÇÃO

$\beta$ -glicosidases [E.C.3.2.1.21] são enzimas presentes em todos os organismos vivos e estão envolvidas em muitos processos biológicos importantes. Estas enzimas clivam ligações  $\beta$ -glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e outra molécula por diferentes mecanismos catalíticos (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010). A ação das  $\beta$ -glicosidases está envolvida em uma gama de processos celulares que se diferem entre os organismos. Por exemplo, em bactérias e fungos, estas enzimas atuam principalmente para obtenção energética fazendo parte do complexo enzimático das celulases, produzindo açúcares fermentáveis e atuam na interação patógeno-hospedeiro (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; KRISCH et al., 2010). Em plantas, a atividade  $\beta$ -glicosidásica também está envolvida em processos chave de desenvolvimento, como crescimento, defesa de patógenos e hidrólise de hormônios (ESEN, 1993; KLECZKOWSKI e SCHELL, 1995). A hidrólise de ligações beta-D-glicosídicas também é frequentemente necessária para a liberação de compostos fisiologicamente importantes como, por exemplo, moléculas de defesa ou toxinas, que são armazenadas em sua forma glicosídica não ativa e que são liberadas após a ação catalítica de  $\beta$ -glicosidases (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010; JONES e VOGT, 2011). Precursores aromáticos em plantas (envolvidos em funções celulares cruciais) existem na forma de glicosídeos, que são formados por compostos voláteis (terpenos, compostos fenólicos e álcoois cíclicos) ligados a uma molécula de açúcar e que são alvo da ação  $\beta$ -glicosidásica levando a liberação de agliconas quando estas são necessárias (GUEGUEN et al., 1997; MATEO e MAICAS, 2005; KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010; BATHIA et al., 2002). De fato, a indústria alimentícia se aproveita e obtém vantagem da adição de  $\beta$ -glicosidases exógenas durante a produção de vinhos, sucos e chás buscando o melhoramento aromático (WANG et al., 2013; SU et al., 2010; GUEGUEN et al., 1997). Estudos recentes demonstraram que bactérias da cavidade bucal presentes na saliva humana tem a capacidade de hidrolisar precursores aromáticos em uvas liberando diferentes tipos de agliconas, inclusive agliconas aromáticas, e que este poderia ser um fator de influência para retenção e percepção individual do aroma e sabor durante e após o consumo do vinho (MUNÓZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Recentemente, a atividade de  $\beta$ -galactosidases na saliva humana foi associada a uma maior concentração de compostos voláteis e halitose. Nestes estudos, os autores sugerem que a desglicosilação e proteólise de glicoproteínas salivares são passos iniciais para putrefação salivar e produção de mau odor bucal (SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012; AYLIKCI e ÇOLAK, 2013; STERER; GREENSTEIN; ROSENBERG, 2002). De fato, estudos anteriores

(TAKEHARA et al., 2010) demonstraram que a desglicosilação de glicoproteínas salivares facilita a proteólise, acelerando a produção de compostos voláteis fétidos. Levando em conta estas evidências, estudamos aqui a possível relação entre a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e a presença de halitose, bem como se a ação direta desta enzima em glicosídeos presentes na saliva humana leva a liberação de agliconas voláteis que influenciam no mau odor bucal. Este estudo pode abrir caminho para um melhor entendimento molecular da ocorrência de halitose e para a exploração de novos mecanismos de ação para o seu controle.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Materiais

P-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG) e celobiose foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todos os reagentes foram adquiridos com a mais alta qualidade disponível.

### 4.2.2 Seleção de voluntários e coleta de saliva

Quarenta e oito voluntários maiores de 18 anos, não fumantes, não gestantes e que não estivessem em uso de antibióticos até 30 dias antes das coletas, foram selecionados para o estudo. Este trabalho foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética de pesquisa em Humanos da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAAE 6703151770000118). Os voluntários receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que fossem realizados os experimentos. Cada um deles recebeu orientações prévias para coleta de saliva e exame odontológico. Foi necessário interromper o uso de enxaguatórios bucais por 48 horas, não consumir bebidas alcoólicas nas últimas 24 horas e todos os voluntários foram instruídos a não se alimentar ou fazer higiene bucal por 2 horas antes da coleta de saliva e do teste do hálito.

Amostras de saliva foram coletadas pela técnica da estimulação mecânica, em que cada voluntário mastigou um sialogogo (1 cm de borracha esterilizada presa a 20 cm de fio dental) por 6 minutos, o primeiro minuto para padronização do fluxo salivar e os outros 5 minutos para coleta (NAVAZESH, 1993). A saliva coletada foi depositada em um tubo tipo *falcon* de 15 mL, refrigerada e imediatamente analisada quanto à atividade enzimática. Parte das amostras foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise por Cromatografia gasosa.

#### 4.2.2.1 Exame clínico Odontológico

Todos os voluntários foram examinados clinicamente por um Cirurgião Dentista para determinar a presença de sinais clínicos associados a halitose (presença de cáries, saburra lingual, biofilme dental, gengivite ou periodontite). A presença e o grau de halitose foram determinados por meio do Teste Organoléptico (TO) e por um monitor portátil de compostos sulfurados (*Breath Checker Tanita HC - 212SF*). O Teste Organoléptico é baseado na análise olfativa do ar exalado pela boca, depois de 30 segundos de manutenção do ar inspirado pelo nariz na cavidade bucal, a uma distância de aproximadamente 20 cm. A presença e a severidade do mau odor bucal foi classificado em uma escala de 0 a 5, em que 0 simboliza ausência do mesmo e 5 halitose severa (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). *Breath Checker Tanita HC - 212SF* foi utilizado como um instrumento portátil para determinar a presença de compostos sulfurados no hálito. Os voluntários foram instruídos a respirar pelo nariz com a boca fechada por 30 segundos e depois expirar pela boca em direção ao dispositivo que indicou e quantificou a presença de compostos sulfurados (0 a 5). Os voluntários que apresentaram 0 em ambos os testes foram considerados sem halitose.

#### 4.2.3 Determinação da atividade $\beta$ -glicosidásica

Para determinar a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva, amostras de saliva fresca, sobrenadante após centrifugação (8000 RPM por 10 min) e saliva após fervura (controle) de 48 voluntários foram analisadas. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, utilizando o substrato cromogênico pNPG (1mM), tampão Fosfato pH 7.2 e 0.075 mL de saliva em um volume final de reação de 0.25 mL. Todas as reações foram monitoradas de forma não contínua, durante 5h em temperatura controlada de 37 °C. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com 0.25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1M e a absorbância foi mensurada a 405 nm. A concentração de produto foi estimada usando o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol (18.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e a atividade enzimática foi calculada a partir das taxas iniciais (<10% de conversão).

#### 4.2.4 Identificação de microrganismos

Amostras de saliva (10  $\mu$ L) de 22 voluntários foram semeadas em placas de agar com meio mínimo enriquecido com celobiose e incubadas a 37°C por 48 horas. Os microrganismos

capazes de hidrolisar e utilizar a celobiose como fonte de carbono para fins energéticos foram isolados e identificados por testes bioquímicos no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC. Algumas colônias bacterianas que se desenvolveram no meio de cultura foram ressuspensas em água *miliq* e esta solução foi utilizada em substituição a saliva em ensaios enzimáticos com pNPG para avaliar a atividade  $\beta$ -glicosidásica dos microrganismos. Outras colônias foram adicionadas ao meio de cultura líquido Luria Bertani (LB), mantidas a 37°C e supervisionadas até que atingissem densidade óptica de 0.500 nm com o objetivo de avaliar a viabilidade dos microrganismos. 1 mL do meio LB líquido contendo bactérias foi centrifugado e o *pelet* bacteriano também foi ressuspensado em água *miliq* para ensaios enzimáticos com intuito de avaliar a atividade  $\beta$ -glicosidásica destas bactérias.

#### **4.2.5 Análise de amostras por Cromatografia Gasosa e Espectrômetro de Massa**

As amostras de saliva restantes de todos os voluntários após os ensaios enzimáticos foram armazenadas a -80°C em frascos tipo *falcon* e posteriormente descongeladas para a análise por cromatografia gasosa. Apenas amostras de saliva com volume suficiente puderam ser utilizadas, totalizando 12 amostras que foram centrifugadas (10.000 G), armazenadas em frascos de vidro com tampas perfurantes e incubadas durante a noite, a 15°C, com 100  $\mu$ L de enzimas  $\beta$ -glicosidases (13,68U/mL) purificadas de *Bacillus polymyxa*. Nas amostras controle a mesma concentração de enzimas inativas (desnaturadas pelo calor) foi utilizada. O *headspace* da reação foi coletado com uma seringa de vidro após o aquecimento das amostras a 60°C por 20 minutos, seguido da injeção de 20  $\mu$ L do gás no Cromatografo gasoso e Espectrômetro de Massa Clarus 680 (*Capillary GC*) – Departamento de Solos do CAV-UDESC. A leitura durou 47 minutos com aquecimento de 30°C a 350°C, utilizando Hélio como gás de arraste e coluna Elite 5MS-30m. Os compostos responsáveis por picos observados durante a cromatografia gasosa foram sugeridos pelo espectrômetro de massa acoplado ao aparelho a partir de informações sobre massa e estrutura química.

#### **4.2.6 Análises estatísticas**

Os resultados deste estudo foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, Teste exato de Fischer e Coeficiente de correlação de postos de Spearman, com 5% de significância, utilizando o *R software* (R CORE TEAM, 2016).

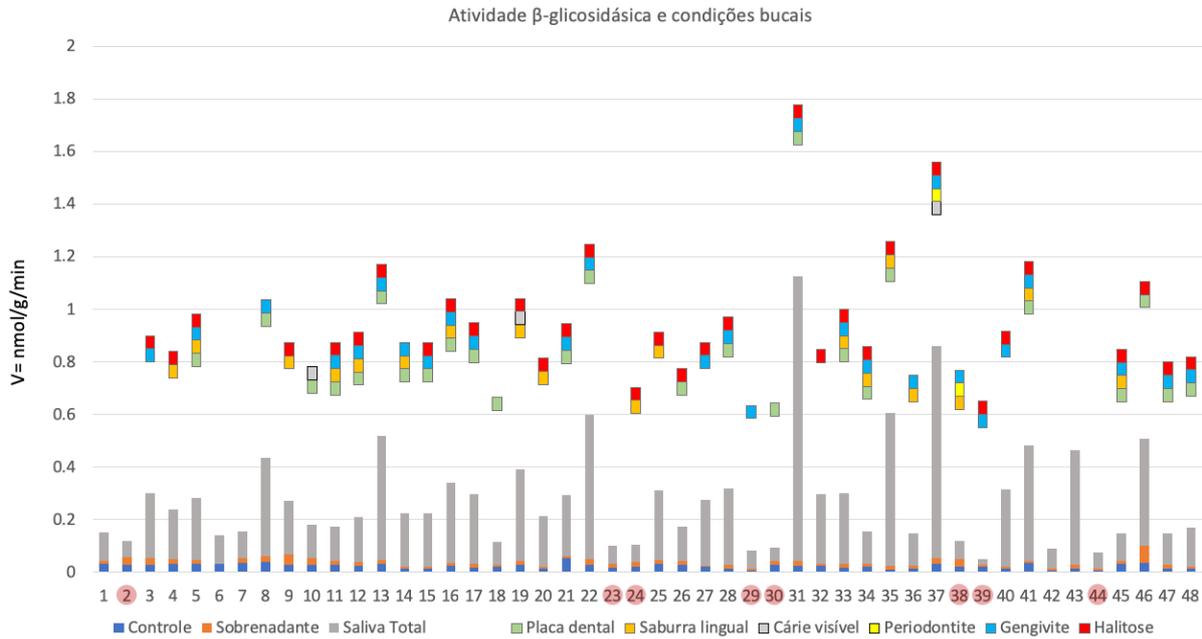
## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Atividade $\beta$ -glicosidásica

A atividade  $\beta$ -glicosidásica foi observada apenas nas amostras contendo saliva fresca e total, não havendo atividade enzimática no sobrenadante após centrifugação assim como nas amostras controle (enzimas desnaturadas), sugerindo uma origem bacteriana da enzima ao invés de uma produção endógena. Os dados dos ensaios enzimáticos foram relacionados com quadros clínicos observados durante o exame odontológico e permitiram o entendimento de que assim como houve grande variabilidade de condições bucais entre os voluntários, a atividade  $\beta$ -glicosidásica entre as amostras de saliva também foi bastante variada (ver Figura 4).

As bactérias que cresceram no meio cultura com celobiose foram identificadas por testes bioquímicos e os resultados sugeriram a presença de diferentes espécies pertencentes aos seguintes grupos bacterianos: *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Serraria sp.* e *Arconobacterium sp.* Todas as colônias identificadas apresentaram atividade  $\beta$ -glicosidásica positiva.

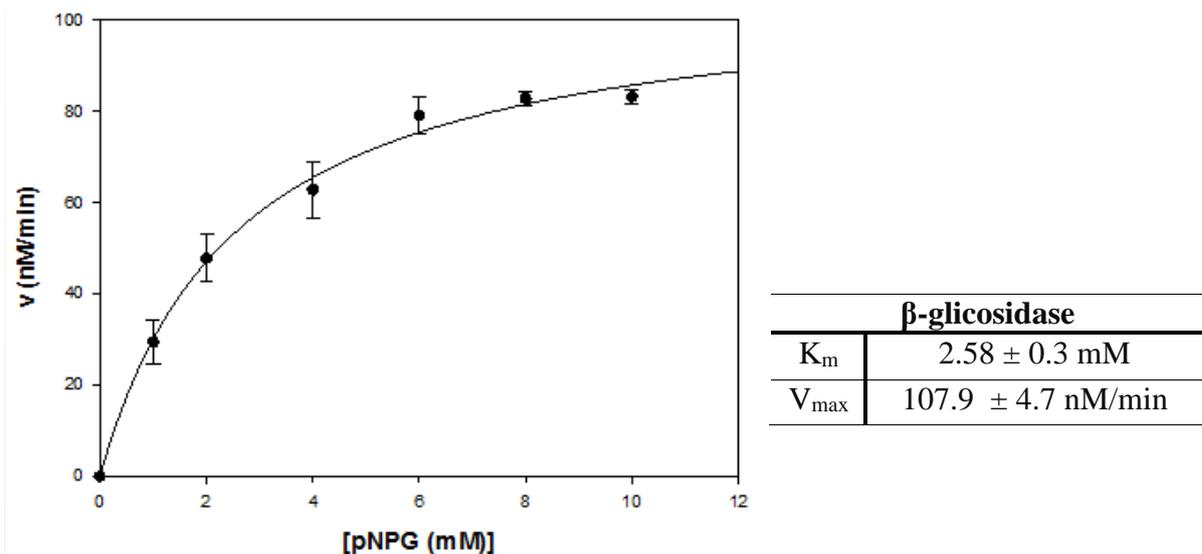
O modelo de Michaelis-Menten foi aplicado para o melhor entendimento do comportamento das enzimas encontradas nas amostras de saliva. Ensaios com diferentes concentrações de pNPG (0, 2, 4, 6, 8, 10 mM) permitiram a determinação dos possíveis parâmetros cinéticos da enzima presente na saliva (ver Figura 5).

Figura 4 - Atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva e condições bucais

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Comparação entre a atividade  $\beta$ -glicosidásica observada em amostras controle (barras azuis), no sobrenadante após centrifugação (barras laranjas) e na saliva fresca e total (barras cinzas). Os círculos vermelhos indicam amostras sem atividade  $\beta$ -glicosidásica ( $V < 0.07$  nmol/g/min) e os dados sugerem atividade enzimática positiva apenas utilizando saliva total para os ensaios. Quadros clínicos observados durante o exame odontológico (presença de placa dental, saburra lingual, cárie, periodontite, gengivite e halitose) estão representados por retângulos coloridos permitindo uma relação inicial entre a atividade  $\beta$ -glicosidásica de cada voluntário e condições bucais.

Figura 5 - Gráfico de Michaelis-Menten e parâmetros cinéticos

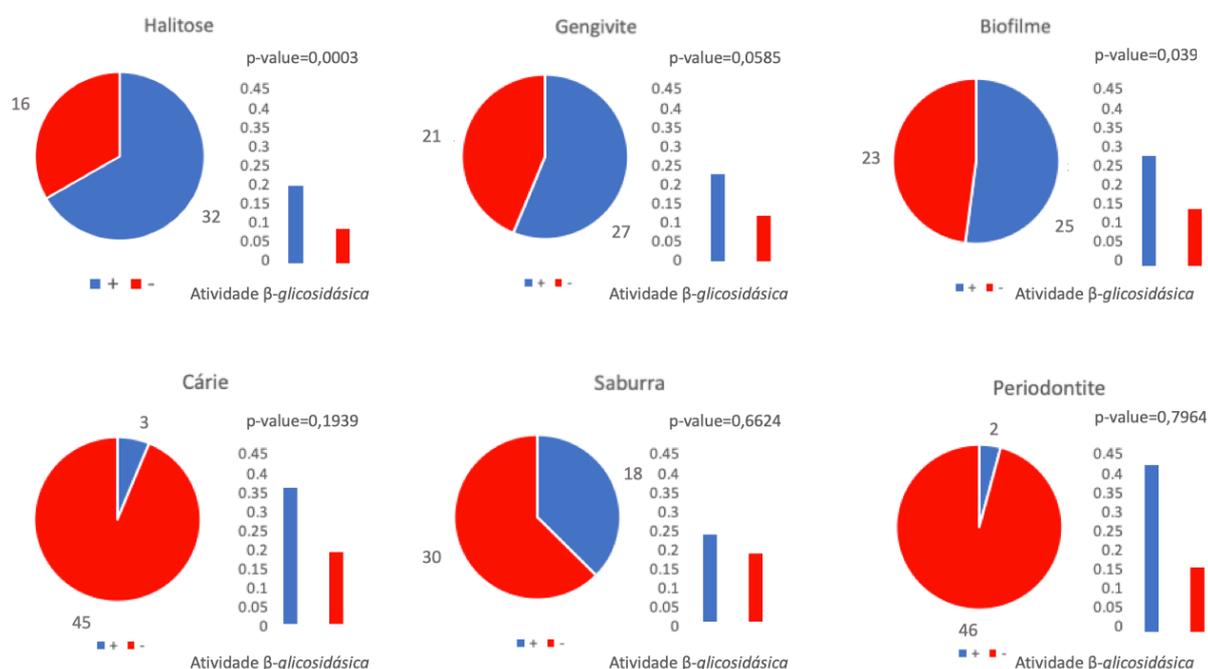


Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Possíveis parâmetros cinéticos de  $\beta$ -glicosidases presentes em amostras de saliva fresca. Os ensaios enzimáticos foram realizados com diferentes concentrações de pNPG (0, 2, 4, 6, 8, 10 mM); 0.15 mL de saliva fresca e tampão Fosfato pH 7.2.

Os dados clínicos obtidos durante o exame odontológico foram correlacionados com a atividade  $\beta$ -glicosidásica. Análises estatísticas demonstraram que houve relação positiva entre a atividade enzimática na saliva e halitose ( $p$ -value = 0.0003) (ver Figura 6). A presença de biofilme dental demonstrou uma correlação menor, mas estatisticamente significativa com a atividade da enzima ( $p$ -value = 0.0390). Nenhum outro dado clínico apresentou relação estatística com a atividade de  $\beta$ -glicosidases neste estudo (ver Figura 6).

Figura 6 - Relação entre atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva e condições bucais



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Relação entre condições bucais observadas no exame clínico odontológico e a atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva. Em azul está representado o número de voluntários com determinada condição clínica bucal e o valor médio da atividade enzimática na saliva dos mesmos. Análises estatísticas sugerem pelo  $p$ -value <0.05 correlação positiva entre a atividade  $\beta$ -glicosidásica e presença de halitose e biofilme dental visível.

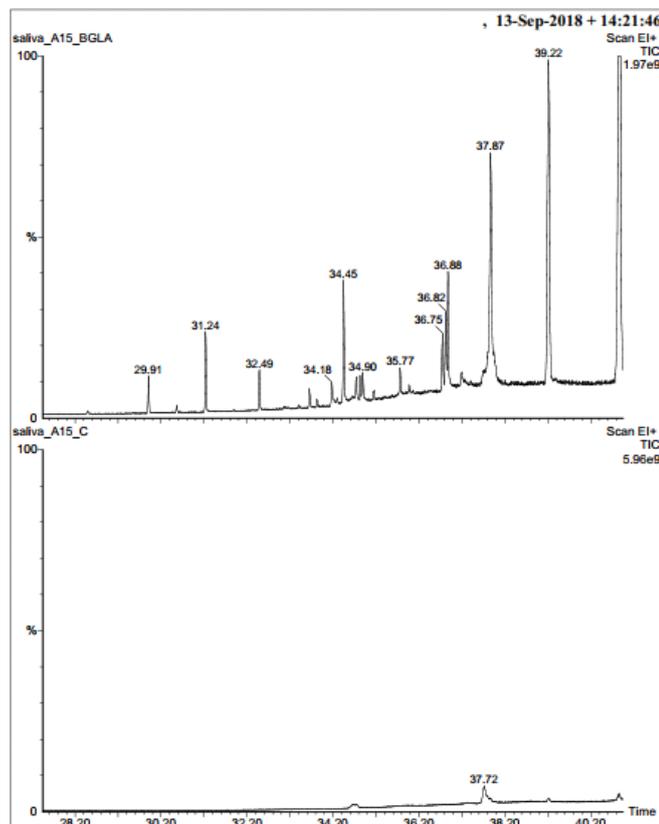
A halitose dos voluntários foi avaliada por meio do Teste Organoléptico e do monitor portátil de compostos sulfurados *Breath Checker Tanita HC - 212SF*. Dos 48 participantes desta pesquisa, 33,3% não possuíam halitose, enquanto que 66.6% apresentaram mau hálito detectado pelo Teste Organoléptico e apenas 20.8% destes exibiram compostos voláteis sulfurados detectados pelo dispositivo portátil. Houve relação positiva e significativa entre a presença de gengivite e halitose, sendo que de 27 voluntários com gengivite, 22 apresentaram algum grau de halitose ( $p$ -value = 0.02907), entretanto, a relação entre gengivite e a atividade  $\beta$ -glicosidásica foi inconclusiva, estando os dados no limite de significância ( $p$ -value = 0.0585)

(ver Figura 6). Isso também foi observado quando a presença de halitose e biofilme dental visível foram correlacionados ( $p\text{-value} = 0.06577$ ).

#### 4.3.2 Perfil de compostos voláteis orgânicos na saliva após adição de $\beta$ -glicosidases exógenas

Para investigar se a ação direta de  $\beta$ -glicosidases sobre substratos presentes na saliva pode alterar o perfil aromático deste fluido corporal, realizamos análises por cromatografia gasosa do *headspace* de amostras de saliva após a adição de enzimas exógenas. A alteração de compostos orgânicos voláteis foi observada em 06 de 12 amostras de saliva testadas (ver Figura 7). Um total de 17 diferentes compostos foram identificados após o tratamento enzimático das 12 amostras e estes estão listados na Tabela 3.

Figura 7 - Alteração do perfil volátil de amostra de saliva humana após a adição de  $\beta$ -glicosidases exógenas



Fonte: Elaborada pela autora, GC-MS Clarus 680, 2018.

Comparação entre picos de compostos voláteis observados durante a cromatografia gasosa de amostra de saliva humana após tratamento com  $\beta$ -glicosidases purificadas de *Bacillus polymyxa* (saliva\_A15\_BGLA) e amostras controle (saliva\_A15\_C). Diferença significativa entre o perfil volátil das amostras, sugerindo relação positiva entre a liberação de compostos voláteis orgânicos na saliva e a atividade  $\beta$ -glicosidásica.

Tabela 3 - Compostos voláteis liberados após ação de  $\beta$ -glicosidases exógenas em amostras de saliva humana

<b>COMPOSTOS VOLÁTEIS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trimetilsilil</li> <li>• 2- (Metiltio) benzotiazole</li> <li>• Acetato de metilamina</li> <li>• 7,8-Epoxilano-11-ol, 3-acetoxi</li> <li>• 9-Desoxo-9-x-acetoxi-3,8,12-tri-O-acetilingol</li> <li>• Ácido 3-piridinocarboxílico</li> <li>• Licoxantina</li> <li>• Ácido carbâmico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluoroacetileno</li> <li>• 4-metil-1-penteno</li> <li>• 2-aziridinil etilamina</li> <li>• Óxido nitroso</li> <li>• Fenetilamina alfa dimetil</li> <li>• 2-bromobutiloxialcona</li> <li>• Ácido pterina-6-carboxílico</li> <li>• Quinolina 1 2-di-hidro-2 2 4-trimetil</li> <li>• N-metil-nicotinimidato, O-trimetilsilil</li> </ul>

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Determinação de 17 possíveis compostos voláteis por GC-MS no *headspace* de amostras de saliva centrifugada após incubação *overnight* com  $\beta$ -glicosidases ativas de *Bacillus polymyxa*.

#### 4.4 DISCUSSÃO / CONCLUSÃO

A atividade de enzimas glicolíticas como as  $\beta$ -galactosidases na saliva humana foi previamente relacionadas a diferentes graus de halitose e putrefação salivar (STERRER et al., 2002). Muitos compostos associados a halitose são produzidos a partir do metabolismo de bactérias orais (SUZUKI; MASAHIRO; HIROFUJI, 2012). De acordo com estudos até o momento, diferentes tipos de enzimas glicosídicas podem ser produzidos por esses organismos, contribuindo para a presença de halitose através da remoção de cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas salivares, facilitando a proteólise e a produção de compostos associados ao metabolismo de aminoácidos (TAKEHARA et al., 2010). No entanto, não existem evidências que confirmem o papel direto das  $\beta$ -galactosidases na liberação de agliconas voláteis provenientes da hidrólise enzimática.

Estudos demonstraram que a saliva humana pode interferir na liberação do aroma de alimentos, reduzindo ou aumentando sua percepção através de diferentes propriedades deste fluido corporal, como por exemplo: diluição de substâncias aromáticas, mudanças no pH e hidratação dos alimentos, interações entre compostos presentes nos alimentos e proteínas ou sais minerais que compõem a saliva, degradação de compostos odoríferos e liberação de precursores aromáticos (MUNÓZ-GONZÁLEZ et al., 2014). A saliva humana é um combinado de composto inorgânicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), compostos orgânicos (enzimas,

polissacarídeos, glicoproteínas, lipídios) e microrganismos, sendo que centenas de bactérias residentes e associados a doenças bucais e sistêmicas podem estar presentes neste fluido corporal (ZHANG et al., 2016). Estudos anteriores investigaram a ação de bactérias orais residentes (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *A. naeslundii*), associadas ao biofilme dental (*S. mutans*, *V. dispar*, *F. nucleatum*) e possivelmente presentes na cavidade bucal (*S. aureus* e *E. faecalis*) sobre precursores aromáticos em forma de glicosídeos isolados de uvas brancas (MUNÔZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Todas as bactérias foram capazes de hidrolisar glicosídeos liberando diferentes tipos de agliconas (terpenos, derivados benzênicos e álcoois) (MUNÔZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Quando os ensaios foram realizados utilizando saliva humana, agliconas aromáticas só foram produzidas com amostras de saliva fresca e nenhum odor foi liberado quando o extrato de uvas brancas foi incubado com o sobrenadante da saliva após centrifugação (MUNÔZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Os resultados encontrados no presente trabalho concordam com estes achados, visto que a atividade  $\beta$ -glicosidásica só foi detectada na saliva total e fresca, sugerindo a origem bacteriana da enzima. De fato, a identificação de colônias cultivadas em meio mínimo enriquecido com celobiose demonstrou que bactérias Gram - e Gram + estão associadas à ação da enzima. Após análise do gráfico de Michaelis Menten e dos prováveis parâmetros cinéticos das  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva fresca, observamos um valor relativamente baixo de  $K_m$ , sugerindo uma afinidade grande entre a enzima e o substrato pNPG.

Stradwick et al. (2017) demonstraram atividade  $\beta$ -glicosidásica no sobrenadante de saliva humana após centrifugação, sugerindo uma produção endógena da enzima. Hipoteticamente a presença de  $\beta$ -glicosidases na saliva poderia estar relacionada ao aumento da concentração de compostos orgânicos voláteis livres na cavidade bucal a partir da hidrólise de glicosídeos, o que causaria uma percepção diferenciada do paladar. No entanto, a atividade não foi correlacionada com dados clínicos e apenas 20% das amostras apresentaram atividade significativa. No presente estudo, os resultados não indicaram atividade  $\beta$ -glicosidásica no sobrenadante das amostras.

Nakamura e Slots (1983), avaliaram a atividade enzimática na saliva e sua relação com a saúde periodontal. Os resultados mostraram que o aumento da atividade de enzimas, incluindo  $\beta$ -glicosidases, foi encontrado na saliva de pacientes com comprometimento periodontal. Dois anos depois os autores determinaram a redução dessas enzimas na saliva após tratamento odontológico adequado (ZAMBON et al., 1985). Poucos voluntários no presente estudo apresentavam periodontite; portanto, não foi possível traçar uma relação positiva e significativa entre esta doença e a atividade enzimática. No entanto, apesar dos dados

estatísticos da relação entre enzima e gengivite estarem no limite de significância, grande parte dos voluntários com gengivite apresentou alta atividade  $\beta$ -glicosidásica, corroborando com estudos anteriores.

Dentes, gengivas e língua são superfícies orais passíveis de acúmulo de microrganismos e componentes salivares, formando o biofilme ou placa dental. Quando o acúmulo do biofilme é persistente, ocorre sua maturação, situação que envolve modificação da microbiota local e adesão de bactérias cada vez mais patogênicas (GIBBONS e ROUTE, 1975; KRIEBEL et al, 2018). A relação positiva encontrada neste estudo entre o biofilme dental e a atividade de  $\beta$ -glicosidases sugere que estas enzimas, produzidas por bactérias orais, são importantes para a sobrevivência dos microrganismos e podem estar associadas à formação e estruturação da placa bacteriana. De acordo com Kilic et al., (2014), que estudaram a expressão e regulação gênica do *S. gordonii* (pioneiro na formação do biofilme dental e associado a endocardite bacteriana), o desempenho energético e a adesividade celular destas bactérias são influenciados por muitos genes ligados ao metabolismo de  $\beta$ -glicosídeos. Estes são importantes para a formação do biofilme e crescimento da linhagem bacteriana, portanto, enzimas como  $\beta$ -glicosidases podem metabolizar açúcares para fornecer energia e fonte de carbono e estar envolvidas em outros processos fisiológicos, como a síntese de glicoproteínas e polissacarídeos (KILIC et al., 2014).

Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato que correlaciona a atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva humana e a ocorrência de halitose. Embora a atividade da enzima também esteja relacionada à presença de biofilme neste estudo, não houve relação estatisticamente significativa entre placa dental e halitose ( $p$ -value = 0.06577), sugerindo que a presença do mau hálito associado a cavidade bucal pode se originar também da ação direta destas enzimas.

De acordo com Sterer, Greenstein; Rosenberg (2002), a presença de glicose pode inibir a produção de compostos fétidos na saliva incubada e os autores explicam esses achados como consequência da inibição da desglicosilação proteica e menor produção de composto sulfurados na presença do açúcar. De fato, a glicose é um conhecido produto e inibidor de  $\beta$ -glicosidases, assim como observado também em nossos estudos (dados indisponíveis). Portanto, a redução de compostos fétidos observados em pesquisas anteriores na presença de glicose pode ser atribuída a sua ação inibitória sobre  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva, diminuindo a liberação de agliconas voláteis.

A halitose é uma alteração multifatorial e enzimas bacterianas, como  $\beta$ -glicosidases, podem contribuir para o seu desenvolvimento. De acordo com um estudo de Takehara et al.

(2010), a desglicosilação de glicoproteínas salivares pelo metabolismo bacteriano e enzimas glicosidases pode facilitar a proteólise e acelerar a produção de compostos voláteis de enxofre. Sabe-se que a halitose associada às condições bucais decorre da degradação microbiana de proteínas, peptídeos e aminoácidos presentes nos fluidos orais bem como da retenção de alimentos entre os dentes (CAMPISI et al., 2011).

Compostos voláteis de enxofre como sulfeto de hidrogênio, metilmercaptano e dimetil sulfeto são os gases mais envolvidos com o mau odor bucal, entretanto, outras substâncias voláteis, incluindo compostos orgânicos aromáticos e aminas, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos orgânicos, álcoois, compostos alifáticos voláteis, aldeídos e cetonas também podem contribuir para a halitose (CAMPISI et al., 2011; VAN DEN VELDE et al., 2007). Embora o monitor portátil para análise do hálito utilizado neste estudo seja capaz de detectar apenas compostos sulfurados, as medidas organolépticas são capazes de indicar a presença de outros compostos voláteis, como álcoois, compostos fenólicos, alcenos, cetonas, poliaminas e ácidos graxos (AYLIKCI e ÇOLAK, 2013). Neste estudo, 45.8% dos voluntários apresentando halitose detectada pelo teste organoléptico não foram positivos para a presença de compostos voláteis de enxofre, o que está de acordo com o fato de que muitos compostos voláteis associados à halitose não são necessariamente compostos sulfurados.

Para confirmar a ação direta de  $\beta$ -glicosidases na liberação de compostos voláteis na saliva humana, adicionamos  $\beta$ -glicosidases exógenas a amostras de saliva após centrifugação e o *headspace* foi analisado por cromatografia gasosa. Observamos a presença de vários compostos voláteis na saliva tratada com enzimas ativas em comparação as amostras controle (enzimas desnaturadas pelo calor). Foram identificados 17 diferentes compostos, entre eles a *Fenilamina* (amina aromática) e a *Metilamina* (derivada do catabolismo de aminas) que apresentam cheiro desagradável, e outros compostos como o *ácido 3-piridinacarboxílico* e o *óxido nitroso* que são inodoros (PUBCHEM, 2018). Nenhum composto conhecido associado a halitose foi encontrado, no entanto, a enzima utilizada origina-se de bactérias presentes no solo (*Bacillus polymyxa*), e a especificidade ao substrato pode variar significativamente em comparação com as enzimas de bactérias orais. Esses resultados sugerem que as  $\beta$ -glicosidases fazem parte de uma gama de enzimas capazes de alterar o perfil volátil e aromático da saliva e que podem ser alvo de outros estudos em saúde bucal e que abordem a importância da saliva para a indústria alimentícia.



## 5 CAPÍTULO II – MANUSCRITO II

### INIBIÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASES PRESENTES NA SALIVA HUMANA POR XILITOL

**Lucimari Teixeira<sup>1</sup>, Anderson Albino Gomes<sup>1</sup>, David Miquelutti <sup>2</sup>, Gustavo Felipe da  
Silva<sup>1</sup> and Maria de Lourdes Borba Magalhães<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Solos e Recursos Naturais, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

#### RESUMO

O biofilme dental é uma das comunidades microbianas mais complexas do corpo humano, em que um conjunto diversificado de microorganismos é incorporado em uma matriz polissacarídica complexa, por meio da adesão a componentes orais. A formação e o acúmulo do biofilme está relacionada a infecções bucais, como cáries e doenças periodontais, portanto, estratégias para seu controle são cruciais para a manutenção da saúde bucal. O xilitol é um açúcar sintético usado como substituto da sacarose que tem a capacidade de reduzir a formação do biofilme bacteriano, no entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Estudos anteriores demonstraram que a ação de  $\beta$ -glicosidases bacterianas é crucial para a formação do biofilme. Neste trabalho investigamos a correlação entre a atividade  $\beta$ -glicosidásica presente na saliva e a ocorrência de placa dental. Os resultados sugerem uma relação positiva entre a atividade enzimática e a presença do biofilme, além disso, esta atividade é reduzida na presença de xilitol. Estudos cinéticos confirmaram que este açúcar sintético atua inibindo a enzima de forma não competitiva. Com base nestas evidências, sugerimos que um dos mecanismos de ação do xilitol sobre a adesão bacteriana e a placa dental é a inibição não-competitiva de  $\beta$ -glicosidases bacterianas que parecem ser essenciais para a formação de biofilme.

**Palavras chave:** Xilitol. B-glicosidase. Biofilme. Saúde bucal. Saliva.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é formada por diferentes superfícies cobertas por uma diversidade de bactérias organizadas em um biofilme que é associado a doenças bucais como cáries e doenças periodontais (AAS et al., 2005; GIBBONS, 1989). A placa, ou biofilme dental, é uma das mais complexas comunidades microbianas no corpo humano, sendo extensivamente estudada e definida como uma diversidade de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular aderida a componentes orais (GIBBONS e HOUTE, 1975; HOUTE, 1982). A adesão bacteriana é pré-requisito e um determinante crítico para a colonização de dentes e superfícies epiteliais. Polissacarídeos são um dos maiores componentes da matriz do biofilme, provendo proteção aos microrganismos presentes, estrutura à placa em formação e desempenhando papel importante para adesão celular (YAMANAKA et al., 2012; LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015; FLEMMING e WINGENDER, 2010). Desta forma, substâncias capazes de interferir na adesão bacteriana às superfícies orais têm importância para o controle do biofilme dental e manutenção da saúde bucal. O xilitol, açúcar sintético utilizado como substituto à sacarose, possui muitas aplicações clínicas e entre suas principais propriedades estão sua capacidade anticariogênica e antiaderente, reduzindo a adesão de bactérias que são importantes para a formação do biofilme (ABDUL RAZAK et al., 2017; ARCAÑO et al., 2018; JANAKIRAM; DEEPAN KUMAR; JOSEPH, 2017; SODERLING et al., 1987). Muitos estudos demonstram que o xilitol atua reduzindo a formação do biofilme dental (SODERLING et al., 1987; SODERLING e HIETALA-LENKKERI, 2010), entretanto, seu modo exato de ação sobre a placa ainda não é completamente compreendido. Algumas enzimas extracelulares foram detectadas no biofilme e muitas delas estão envolvidas na degradação de biopolímeros gerando moléculas que podem ser fonte de carbono e energia, além disso, podem estar associadas ao processos de dispersão bacteriana e fatores de virulência (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Enzimas bacterianas como glicosiltransferases e glicosilhidrolases desempenham importante papel para adaptação e sobrevivência de microrganismos, atuando na quebra e síntese de variados carboidratos (INUI et al., 2015).  $\beta$ -glicosidases catalisam reações de hidrólise e também de transglicosilação, gerando produtos alongados importantes para a formação do biofilme (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). Estas enzimas já foram encontradas na saliva e fluidos orais, porém, sua origem específica ainda é incerta. Estudos de expressão gênica de *Streptococcus gordinii*, um dos pioneiros na formação do biofilme dental, sugerem que  $\beta$ -glicosidases são essenciais para a formação da placa (KILIC et al., 2004). Algumas pesquisas demonstram que estas enzimas, provenientes de amêndoas doce, podem ser

inibidas por xilitol (KELEMEN e WHELAN, 1966), e que esse poliálcool também reduz a atividade de enzimas digestivas como  $\alpha$ -glicosidases (CHUKWUMA e ISLAM, 2015). Neste contexto, investigamos a correlação entre  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva humana e o biofilme dental, bem como a ação do xilitol sobre a atividade destas enzimas, sugerindo uma forma ainda não explorada de atuação deste açúcar sintético para o controle da placa.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Materiais

Glicose, *p-nitrophenyl-b-d-glucoopyranoside* (pNPG) e xilitol foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (St. Louis, Missouri, EUA).

### 5.2.2 Seleção de voluntários e coleta de saliva

Amostras de saliva mecanicamente estimulada de 41 voluntários (dos 48 participantes da pesquisa), maiores de 18 anos, não fumantes, não gestantes e que não estivessem em uso de antibióticos nos últimos 30 dias antes da coleta foram utilizadas para os ensaios enzimáticos. A coleta de saliva foi realizada pela técnica de estimulação mecânica, em que cada voluntário mastigou um pedaço de borracha esterilizada (sialogogo) por 6 min. O primeiro minuto de estimulação foi usado para padronizar o fluxo salivar e os 5 min restantes para coleta de saliva. Toda a saliva produzida nos 5 minutos de estimulação foi depositada em copos descartáveis, mensurada e depois transferida para tubos tipo *falcons* esterilizados. Essa técnica também permitiu determinar o fluxo salivar de cada voluntário (NAVAZESH, 1993). Os voluntários receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e foram orientados a não se alimentar ou realizar higiene bucal por duas horas antes da coleta. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAAE 67031517700000118).

### 5.2.3 Ensaios enzimáticos

A atividade enzimática foi determinada por ensaios em triplicata utilizando o substrato pNPG (1mM) em tampão fosfato pH 7.2, na presença e na ausência de xilitol (20 mM). Todas as reações foram monitoradas de forma não contínua e a atividade enzimática foi

calculada a partir das taxas iniciais (<10% de conversão). Resumidamente, as reações foram realizadas em tampão fosfato pH 7.2 na presença de 75 µL de saliva e 1 mM de pNPG durante cinco horas, a 37°C. Após o período de incubação, o ensaio foi interrompido com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M e a absorbância foi medida a 405 nm. A concentração do produto foi estimada utilizando o coeficiente de extinção do p-nitrofenol (18.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Amostras de saliva fervida foram utilizadas como controle. A presença ou ausência de biofilme dental visível foi determinada através de um exame clínico odontológico realizado por um cirurgião dentista.

#### 5.2.3.1 Inibição da atividade β-glicosidásica por xilitol

Para obter o gráfico de Lineweaver-Burk a reação enzimática foi realizada usando concentrações variáveis de pNPG (0.5, 2, 4, 6, 8 e 10mM) e concentrações variáveis de xilitol (0, 5, 10, 20 e 40mM) em tampão fosfato. O gráfico de Lineweaver-Burk foi obtido plotando os recíprocos das taxas iniciais em comparação com as várias concentrações de substrato. Os dados foram analisados utilizando o programa *SigmaPlot Enzyme Kinetics Module v1.3*.

#### 5.2.5 Análises estatísticas

Os resultados deste estudo foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, Teste exato de Fischer e Coeficiente de correlação de postos de Spearman, com 5% de significância, utilizando o *R software* (R CORE TEAM, 2016).

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da atividade β-glicosidásica na saliva total fresca e no sobrenadante após a centrifugação demonstrou atividade significativa (em 83% das amostras) somente quando a saliva total foi utilizada. Amostras de saliva foram semeadas em meio contendo celobiose para selecionar microrganismos β-glicosidase positivos. Colônias individuais foram coletadas e testadas apresentando atividade β-glicosidásica significativa (dados não disponíveis). Assim, a atividade enzimática observada neste estudo foi associada ao *pellet* de células bacterianas, e tais resultados concordam com estudos prévios que afirmam que a atividade de β-glicosidases presentes na saliva humana se origina principalmente de microrganismos ou componentes salivares insolúveis (NAKAMURA e SLOTS, 1983). Estudos anteriores demonstraram que

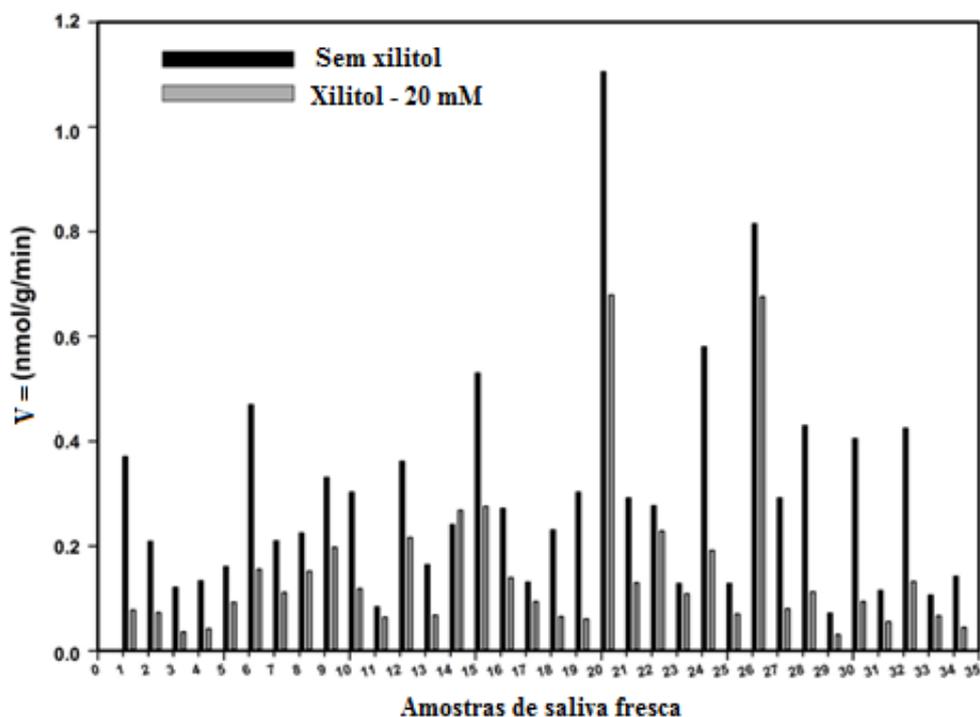
maior atividade  $\beta$ -glicosidásica é encontrada em pacientes com doenças periodontais que são relacionadas com a presença de biofilme dental, associando o tratamento adequado a uma redução na atividade enzimática (NAKAMURA e SLOTS, 1983; ZAMBON et al., 1985). No presente estudo, quando a atividade de  $\beta$ -glicosidases e a placa dental foram avaliadas, observou-se uma relação positiva e significativa ( $p$ -value = 0.03904), confirmando que a presença de biofilme dental clinicamente visível está associada a maior atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva (ver Tabela 4). Estas enzimas já foram encontradas em biofilmes aquáticos e agregados marinhos (FLEMMING e WINGENDER, 2010) e curiosamente, trabalhos anteriores sobre a formação de biofilme aquático demonstraram que a atividade de  $\beta$ -glicosidases foi positivamente relacionada a maior presença de moléculas que compõem a matriz do biofilme, além disso, a atividade enzimática foi maior em biofilmes jovens (1 a 4 dias de formação), sugerindo que a enzima possa estar associada a adesão bacteriana (ROMANI et al., 2008) e estar envolvida na síntese dos polissacarídeos da matriz extracelular, sendo importante para a formação do biofilme. No presente estudo, 83% das 41 amostras de saliva apresentaram atividade  $\beta$ -glicosidásica positiva e a maioria delas (33 de 34) foi suscetível à inibição por xilitol (ver Figura 8). A inibição de  $\beta$ -glicosidases provenientes de amêndoas doce por polióis foi previamente demonstrada (NAKAMURA e SLOTS, 1983), além disso, o xilitol se mostrou capaz de inibir enzimas digestivas, como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase e esta ação inibitória pode estar associada a suas propriedades antidiabéticas, sugerindo que os efeitos de controle glicêmico em diabéticos estão relacionados à diminuição da atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos (CHUKWUMA e ISLAM, 2015).

Tabela 4 - Atividade  $\beta$ -glicosidásica na saliva humana e sua relação com a presença de biofilme dental

<b>Biofilme Dental</b>	<b>N</b>	<b>Atividade <math>\beta</math>-glicosidásica (nmol/g/min)</b>
Presença	25	0.29± 0.04
Ausência	23	0.15± 0.03
Total	48	

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Tabela demonstrando diferenças significativas nos valores médios  $\pm$  erro da atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva entre grupos de pacientes com biofilme e sem biofilme dental. N: número de pacientes.

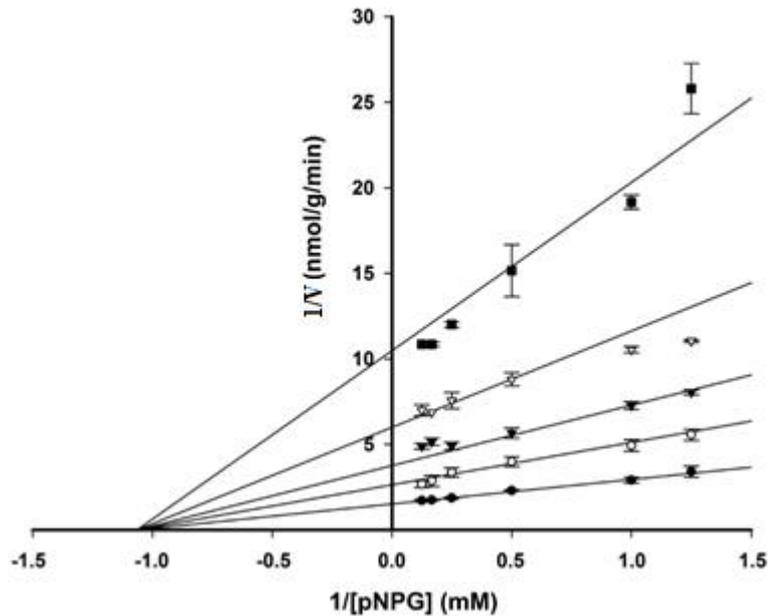
Figura 8 - Inibição de  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva humana por xilitol

Fonte: Elaborada pela autora, 2019 - *SigmaPlot Enzyme Kinetics Module v1.3*.

Gráfico demonstrando a ação inibitória do xilitol sobre  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva humana. A atividade  $\beta$ -glicosidásica foi determinada na presença de xilitol 20 mM (barras cinzas) e na ausência de xilitol (barras pretas).

Neste trabalho, estudos cinéticos de inibição foram realizados utilizando saliva total fresca e concentrações variáveis de pNPG e xilitol. A análise do gráfico duplo recíproco demonstrou a inibição não competitiva do xilitol sobre a enzima  $\beta$ -glicosidase, apresentando um valor de  $K_i$  de 6.8 mM (ver Figura 9). Na literatura, várias evidências demonstram que o xilitol possui importantes aplicações na saúde bucal, especialmente para o controle de bactérias cariogênicas (ARCAÑO et al., 2018; JANAKIRAM; DEEPAN KUMAR; JOSEPH, 2017; SODERLING et al., 1987; NAYAK; NAYAK; KHANDELWAL, 2014). Abdul Razak et al (2017) avaliaram o efeito inibitório do xilitol na formação de biofilmes de *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, sugerindo que o xilitol tem a capacidade de inibir a formação de biofilme em cerca de 68% quando usado como substituto da sacarose.

Figura 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk. Inibição não competitiva do xilitol sobre  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva humana



Fonte: Elaborada pela autora, 2019 - *SigmaPlot Enzyme Kinetics Module v1.3*.

Gráfico duplo recíproco da atividade  $\beta$ -glicosidásica na presença de xilitol a 0 (●), 5 mM (○), 10 mM (▼), 20 mM (Δ) e 40 mM (■) e concentrações variadas de pNPG. A inibição do tipo não competitiva é observada pela intersecção do eixo Y.

Estudos anteriores também demonstraram que o xilitol é capaz de reduzir a adesão bacteriana e a produção de polissacarídeos em algumas espécies de *Streptococcus*, sendo que e sua ação antiaderente não pareceu estar associada à inibição do crescimento bacteriano (SODERLING e HIETALA-LENKKERI, 2010). No entanto, seu modo específico de ação para inibição do biofilme não foi descrito até o momento. Segundo Kilic et al. (2004), que estudaram a regulação gênica de *S. gordonii* (um dos microrganismos pioneiros na formação do biofilme dental), a adesividade bacteriana é influenciada pela expressão gênica de  $\beta$ -glicosidases e quando genes associados a enzima são suprimidos, há redução expressiva de moléculas da matriz extracelular e da formação de biofilme bacteriano. Isso concorda com outros estudos que sugerem que exopolissacarídeos são indispensáveis para a formação do biofilme já que organismos mutantes que não sintetizam estas moléculas, não são capazes de produzi-lo (FLEMMING e WINGENDER, 2010). A importância de exopolissacarídeos nos biofilmes foi demonstrada em estudos recentes, sendo que a quebra de exopolissacarídeos-chave pode levar a desorganização do biofilme, dispersão de bactérias e aumentar a sensibilidade do biofilme a antibióticos (KOOH et al., 2017).

Neste trabalho, sugerimos uma correlação positiva entre a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e a presença de biofilme dental, indicando que esta enzima pode ser importante para o estabelecimento do biofilme na cavidade bucal. Além disso, demonstramos que o xilitol inibe a atividade de  $\beta$ -glicosidases na saliva humana e dada a provável importância desta enzima para a formação do biofilme dental, sua inibição não competitiva pelo xilitol é um possível modo de ação para a capacidade antiaderente deste poliálcool.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A halitose é uma das queixas mais comuns dos pacientes no consultório Odontológico e apesar de ser multifatorial está na maioria das vezes associada a condições bucais, especialmente ao metabolismo de bactérias orais que gera subprodutos fétidos associados ao mau odor bucal. Enzimas glicosídicas como  $\beta$ -galactosidases já foram citadas na literatura por serem capazes de produzir a desglicosilação de glicoproteínas salivares, facilitando o processo de proteólise e conseqüentemente a liberação de compostos sulfurados relacionados ao mau odor bucal. Entretanto, muito ainda precisa ser entendido sobre a atividade de enzimas glicosídicas nos fluidos orais, tanto em relação a sua origem, função como conseqüências clínicas.  $\beta$ -glicosidases são enzimas glicosídicas presentes em todos organismos vivos que além de desempenharem funções biológicas, têm sido exploradas para a liberação de compostos voláteis buscando o enriquecimento aromático de alimentos e bebidas com finalidade comercial, porém, sua ação na cavidade bucal e sua relação com condições clínicas ainda não é compreendida. Os dados deste trabalho sugerem que a presença destas enzimas na saliva humana está relacionada a microbiota bucal e que a atividade enzimática difere de indivíduo para indivíduo, estando associada a condições clínicas como presença de biofilme dental visível, halitose e gengivite. Sugerimos que a enzima possa estar associada a reações de hidrólise de glicoproteínas e glicosídeos quando há depleção de glicose no meio, levando a liberação de compostos voláteis e fétidos associados a proteólise (que é facilitada pela remoção da porção glicídica das glicoproteínas) e a quebra direta de glicosídeos provenientes da dieta, podendo contribuir para a halitose.

A microbiota bucal é variável e pode se apresentar sobre as superfícies orais (dentes e mucosas) em forma de biofilme bacteriano, que favorece o crescimento e o desenvolvimento de microrganismos desempenhando função estrutural, energética e protetiva às bactérias. A capacidade de adesão às superfícies bucais é imprescindível para a produção e amadurecimento do biofilme dental. Muitas doenças bucais estão associadas ao acúmulo deste biofilme e medidas para sua prevenção e controle são essenciais para promoção e manutenção da saúde bucal. Os dados do presente trabalho sugerem relação positiva entre a presença de biofilme dental clinicamente visível e atividade de enzimas  $\beta$ -glicosidases na saliva, sugerindo que estas enzimas glicosídicas podem também estar associadas a produção de biomoléculas como polissacarídeos que são importantes para a adesão bacteriana e estabelecimento do biofilme na cavidade bucal. Sugerimos então que as enzimas  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva podem

atuar de formas diferentes de acordo com a necessidade energética e metabólica dos microrganismos.

O xilitol já é descrito na literatura como um açúcar substituinte à sacarose que pode ser utilizado por pacientes diabéticos, tem propriedade anticariogênica e também antiaderente, interferindo na adesão bacteriana a superfícies vítreas, podendo ser utilizado em produtos de higiene oral e gomas de mascar. Na literatura podem ser encontrados relatos antigos em relação ao xilitol e sua eficácia para inibição de enzimas como  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -glicosidases de amêndoas doce e, de forma interessante, os dados do presente trabalho sugerem que o xilitol tem capacidade inibitória sobre  $\beta$ -glicosidases presentes na saliva humana. Sabe-se que o xilitol possui propriedade antiadente, porém, seu exato modo de ação ainda não é totalmente compreendido. Dada a provável importância da  $\beta$ -glicosidase para a formação do biofilme dental, sua inibição não competitiva pelo xilitol pode ser uma das explicações para a interferência deste açúcar sintético sobre a adesão bacteriana.

Esses achados são de impacto não só pela sugestão de um novo e inexplorado modo de ação molecular para a inibição do biofilme dental exercido pelo xilitol, mas também por destacar o papel da  $\beta$ -glicosidase como uma enzima que pode fazer parte de uma gama de enzimas provenientes de microrganismos que possivelmente estão associadas a produção de compostos associados a halitose, podendo ser alvo de drogas para o desenvolvimento de novos e melhores métodos terapêuticos para o controle da placa bacteriana e do mau odor bucal.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J.A et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, 43(11):5721-32, 2005.
- ABDUL RAZAK, F et al. Alternative sweeteners influence the biomass of oral biofilm. **Archives of Oral Biology**, 80:180-184, 2017.
- ARAMPATZI, S.I.; GIANNOGLOU, G.; DIZA, E. Biofilm formation: A complicated microbiological process. **Aristotle University Medical Journal**, 38 (2), 21-25, 2011.
- ARCAÑO, Y.D. et al Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. **Catalysis Today**, 2018.
- AYLIKCI, B. U.; ÇOLAK, H. Halitosis: From diagnosis to management. **J. Nat Sci Biol Med**, 4(1):14-23, 2013.
- BHATIA, Y.; MISHRA S.; BISARIA, V.S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22(4):375-407, 2002.
- BOLLEN, C.M.L.; BEIKLER, T. Halitosis: the multidisciplinary approach. **International Journal of Oral Science**, 4, 55–63, 2012.
- BOWEN, W. H et al. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends in Microbiology**, 26(3), 229–242, 2018.
- BUETTNER, A. Influence of human salivary enzymes on odorant concentration changes occurring in vivo. 1. Esters and thiols. **J Agric Food Chem**. 50(11):3283-9, 2002.
- CALI, C.M et al. What causes bad breath? **Rev. Odontol. UNESP**, 35(3),185-190, 2006.
- CAMPISI, G et al. Halitosis: could it be more than mere bad breath? **Intern Emerg Med**, 6:315–319, 2011.
- CHAUDHARY, S et al. The use of Enzymes in Food Processing: A Review. **South Asian Journal of Food Technology and Environment**, 5454-6445, 2015.
- CHUKWUMA, C.I.; ISLAM, M.D. Effects of xylitol on carbohydrate digesting enzymes activity, intestinal glucose absorption and muscle glucose uptake: a multi-mode study. **Food Funct**, 6, 955-962, 2015.
- COOKSEY, K.E.; WIGGLESWORTH-COOKSEY, B. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. **Aquatic Microbial Ecology**, 9: 87-96, 1995.
- CROUT, D.H.; VIC, G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2(1):98-111, 1998.
- DONALDSON, A.C et al. Cinical examination of subjects with halitosis. **Oral Diseases**, 13,63-70, 2007.
- ESEN, A.  $\beta$ -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology. ACS Symposium Series. **American Chemical Society**, Washington, DC, pp 1–14, 1993.

- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**; 8(9), 623–633, 2010.
- FUQUA, C et al. Biofilms 2018: A diversity of microbes and mechanisms, **J. Bacteriol.** 2019
- GIBBONS, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **J Dent Res**, 68(5):750-60, 1989.
- GIBBONS, R.J.; HOUTE, J.V. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu Rev Microbiol.** 29:19-44, 1975.
- GUEGUEN, Y et al. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, 55 (3), 151-156, 1997.
- HOUTE, J.V. Bacterial adherence and dental plaque formation. **Infection**, 10 (4):252-260, 1982.
- INUI, T et al. Extracellular Glycoside Hydrolase Activities in the Human Oral Cavity. **Appl Environ Microbiol**, 81(16):5471-6, 2015.
- JANAKIRAM, C.; DEEPAN KUMAR, C. V.; JOSEPH, J. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. **J Nat Sci Biol Med**, 8(1): 16–21, 2017.
- JONES, P.; VOGT, T. Glycosyltransferases in secondary plantmetabolism: tranquilizers and stimulant controllers. **Planta**, 213:164–174, 2001.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I.B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis - A review. **J Clin Periodontol**, 27(7):453-65, 2000.
- KEERTI et al. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable  $\beta$ -Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Biochemistry**, 2014.
- KELEMEN, M.V.; WHELAN, W.J. Inhibition of B-glucosidases and  $\beta$ -galactosidases by polioys. **Archives of biochemistry and biophysics**, 117, 423-428, 1966.
- KETUDAT CAIRNS, J.R.; ESEN, A. B-glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67:3389–3405, 2010.
- KILIC, A.O et al. Involvement of *Streptococcus gordonii* Beta-Glucoside Metabolism Systems in Adhesion, Biofilm Formation, and In Vivo Gene Expression. **Journal of Bacteriology**, 4246–4253, 2004.
- KLECZKOWSKI, K.; SCHELL, J. Phytohormone conjugates: nature and function. **Crit Rev Plant Sci**, 14: 283–298, 1995.
- KLEINBERG, I.; WESTBAY, G. Salivary and metabolic factors involved in oral malodor formation. **J Periodontol**, 63(9):768-75, 1992.
- KOO, H et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nat Rev Microbiol**, 15, 740–755, 2017.

KRIEBEL, K et al. Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease - Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase. **Front. Microbiol**, 9, 2018.

KRISCH, J et al. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from *Zygomycetes*. In book: **Current Research; Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Edition: Microbiology book series - Number 2, Publisher: Formatex Research Center, Editors: Méndez-Vilas A, pp.891-896, 2010.

KUANG, X.; CHEN, V.; XU, X. Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. **BioMed Research International**, 2018.

KUBONIWA, M.; LAMONT, R.J. Subgingival biofilm formation. **Periodontol**, 52(1): 38–52, 2010.

LARSSON, B.T. Gas Chromatography of organic volatiles in human breath and saliva. **Acta Chem Scand**, 19:159-64, 1965.

LIMOLI, D. H.; JONES, C.J.; WOZNIAK, D.J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiol Spectr**, 3(3), 2015.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, 38(3):204-211, 2004.

MARSH, P.D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **J Clin Periodontol**, 44 (18):12-22, 2017.

MASUO, Y et al. Salivary  $\beta$ -galactosidase activity affects physiological oral malodor. **Archives of Oral Biology**, 57, 87– 93, 2012.

MATEO, J.J; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, 881, 557-567, 2000.

MATEO, J.J; MAICAS, S. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, 67: 322–335, 2005.

MUÑOZ-GONZALEZ, C et al. Ability of human oral microbiota to produce wine odorant aglycones from odourless grape glycosidic aroma precursors. **Food Chem**, 15;187:112-9, 2015.

MUÑOZ-GONZALEZ, C et al. Understanding the Role of Saliva in Aroma Release from Wine by Using Static and Dynamic Headspace Conditions. **J. Agric. Food Chem**, 62, 8274–8288, 2014.

NAKAMURA, M.; SLOTS, J. Salivary enzymes - Origin and relationship to periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, 18 (6), 559–569, 1983.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

NAVAZESH, M. Methods for Collecting Saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 694: 72–77, 1993.

- NAYAK, P.A.; NAYAK, U.A.; KHANDELWAL, V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. **Clin Cosmet Investig Dent**, 6: 89-94, 2014.
- PEI, X et al. Heterologous expression of a GH3  $\beta$ -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Protein Expr Purif**, 119:75-84, 2016.
- PETER, H et al. Multifunctionality and Diversity in Bacterial Biofilms. **Plos One**, 6 (8), 2011.
- PLOYON, S.; MORZEL, M.; CANON, F. The role of saliva in aroma release and perception. **Food Chem**. 1;226:212-220, 2017.
- R CORE TEAM: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2016. <https://www.R-project.org/>.
- ROMANI, A.M et al. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. **Microb Ecol**, 56(3):427-36, 2008.
- ROMO-SÁNCHEZ, S et al. Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase and Its Application for Enhancement of Aroma Precursors in Muscat Wine. **Food and Bioprocess Technology**, 7, 1381-1392, 2014.
- SCHENKELS, L.C.P.M et al. Biochemical Composition of Human Saliva in Relation to Other Mucosal Fluids. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, 6 (2), 161-175, 1995.
- SCHIPPER, R.G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M.H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Arch Oral Biol**, 52(12):1114-35, 2007.
- SINGH, G.; VERMA, A.K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. **Biotech**, 6 (1): 3, 2016.
- SOCRANSKY, S.S.; MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J Periodontol**, 42(8):485-96, 1971.
- SODERLING, E et al. Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, 21(2):109-16, 1987.
- SODERLING, E.M.; HIETALA-LENKKERI, A.M. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. **Curr Microbiol**, 60(1):25-9, 2010.
- STERER, N.; GREENSTEIN, R.B.; ROSENBERG, M.  $\beta$ -Galactosidase Activity in Saliva is Associated with Oral Malodor. **J Dent Res**, 81: 182, 2002.
- STRADWICK, L et al. Development and application of assay for determining  $\beta$ -glucosidase activity in human saliva. **Flavour**, 6:1, 2017.
- SU, E et al. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioprocess Processing**, 88, 83–89, 2010.

- SUZUKI, N.; MASAHIRO, Y.; HIROFUJI, T. Relationship between Oral Malodor and Oral Microbiota. **Oral Health Care - Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions**, 2012.
- TAKEHARA, S et al Relationship between Oral Malodor and Glycosylated Salivary Proteins. **Med Dent Sci**, 57 : 25–33, 2010.
- TENOVUO, O. J. Human Saliva. **Clinical Chemistry and Microbiology**, 2, Ed. CRC. 1989.
- THONGEKKAEW, J et al. Evaluation of *Candida easanensis* JK8  $\beta$ -glucosidase with potentially hydrolyse non-volatile glycosides of wine aroma precursors. **Natural Product Research**, 1-5, 2018.
- TONZETICH, J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. **J Periodontol**, 48(1):13-20, 1977.
- VAN DEN VELDE, S et al. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. **Journal of Chromatography**, 853, 54–61, 2007.
- WALLE, T et al. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. **J Nutr**, 135(1):48-52, 2005.
- WANG, Y et al. Different influences of  $\beta$ -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. **Food Chem**, 140 (1-2):245-54, 2013.
- WATANABE, T et al. Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, 209(2), 651–659, 1992.
- YAMANAKA, T et al. Exopolysaccharide Productivity and Biofilm Phenotype on Oral Commensal Bacteria as Pathogenesis of Chronic Periodontitis. **Standard Form**, 298 (Rev. 8-98), 2012.
- ZAMBON, J. J et al. Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity. **J Periodontal Res**, 20(6):652-65, 1985.
- ZAPPACOSTA, B et al. HPLC analysis of some sulphur compounds in saliva: comparison between healthy subjects and periodontopathic patients. **International Journal of Clinical Chemistry**, 338 (57-60), 2003.
- ZHANG, C et al. Saliva in the diagnosis of diseases. **International Journal of Oral Science**, 8(3): 133–137, 2016.



## APÊNDICES

### APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa de mestrado intitulada “Estudo da ação de  $\beta$ -glicosidasases na volatilização de compostos aromáticos em saliva humana e sua possível relação com halitose”, que fará entrevista, exame clínico e coleta de saliva, tendo como objetivo investigar se a ação acentuada de uma enzima na saliva pode estar relacionada com o mau hálito (halitose). Serão previamente marcados a data e horário para a entrevista, exame clínico, teste do hálito e coleta de saliva, utilizando material descartável e esterilizado, um questionário de múltipla escolha a ser respondido sobre sua saúde e hábitos alimentares e de higiene e um equipamento portátil para avaliação da halitose, o Halímetro (*Breath Checker Tanita HC – 212SF*). Estas medidas serão realizadas no consultório odontológico do Setor de Saúde do CAV – UDESC. Não é obrigatório participar deste estudo, bem como participar de todas as partes da pesquisa (responder questionários, avaliar o hálito, realizar o exame clínico odontológico e fazer a coleta de saliva).

O(a) Senhor(a) e seu/sua acompanhante não terão despesas e nem serão remunerados pela participação na pesquisa. Todas as despesas decorrentes de sua participação serão ressarcidas. Em caso de dano, durante a pesquisa será garantida a indenização.

Os riscos deste estudo são médios visto que haverá exame clínico odontológico e periodontal que pode causar desconforto local e mais raramente, um pequeno sangramento gengival se houver inflamação deste tecido. Este sangramento pode ser interrompido de forma espontânea ou com pressão local com gaze. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados acompanhados de barreiras de acordo com orientações de biossegurança para evitar contaminação cruzada. Tanto o exame clínico, como a coleta de saliva e a entrevista serão realizados individualmente, reduzindo os riscos de constrangimento ao participante. Além disso, somente a pesquisadora responsável pelo estudo e a orientadora terão contato com os dados obtidos na pesquisa.

A sua identidade será preservada pois cada indivíduo será identificado por um número, bem como seu questionário respondido, seu exame clínico e de halitose e sua amostra salivar.

Os benefícios e vantagens em participar deste estudo serão diretos e imediatos, mas também indiretos e tardios. Como benefícios indiretos e tardios está a cooperação para pesquisas científicas na área da saúde e de ciências biológicas, que podem trazer benefícios a curto ou longo prazo para toda a população em relação ao diagnóstico e tratamento do mau hálito. Como benefícios diretos os participantes passarão por um exame clínico odontológico em que a cirurgiã dentista responsável pela pesquisa poderá identificar problemas bucais e orientá-los quanto ao tratamento. Lembrando que não serão realizados tratamentos para mau hálito ou possíveis alterações bucais diagnosticadas, apenas serão realizadas orientação e encaminhamento para tratamento odontológico no Setor de Saúde do CAV se houver necessidade.

As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos e os dados da pesquisa serão a cirurgiã dentista e estudante de mestrado Lucimari Teixeira Essenfelder e a professora responsável Maria de Lourdes Borba Magalhães. O cirurgião dentista responsável pelo consultório odontológico do Setor de Saúde do CAV- UDESC poderá estar presente, mas não terá relação com a pesquisa, não tendo acesso aos dados coletados por meio da entrevista, exame clínico e exame do hálito.

O(a) senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não-identificação do seu nome.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do pesquisador e outra com o sujeito participante da pesquisa.

NOME DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL PARA CONTATO: Lucimari T. Essenfelder

NÚMERO DO TELEFONE: 041 9 99408825

ENDEREÇO: Av. Luís de Camões, 2090 - Conta Dinheiro, Lages - SC, 88520-000.

ASSINATURA DO PESQUISADOR:

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – CEPESH/UDESC

Av. Madre Benvenuta, 2007 – Itacorubi – Florianópolis – SC -88035-901

Fone/Fax: (48) 3664-8084 / (48) 3664-7881 - E-mail: [cepsh.reitoria@udesc.br](mailto:cepsh.reitoria@udesc.br) / [cepsh.udesc@gmail.com](mailto:cepsh.udesc@gmail.com)

CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

SEPN 510, Norte, Bloco A, 3º andar, Ed. Ex-INAN, Unidade II – Brasília – DF- CEP: 70750-521

Fone: (61) 3315-5878/ 5879 – E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso:

\_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ .

## APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO

1. Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino
2. Está em tratamento médico? ( ) sim ( ) não
3. Tem queixa de mau hálito? ( ) sim ( ) não
4. Faz uso de alguma medicação diariamente? ( ) sim ( ) não  
Qual? \_\_\_\_\_
5. Está tomando ou tomou antibióticos nos últimos 30 dias? ( ) sim ( ) não
6. É ex- fumante? ( ) sim ( ) não
7. Frequência de ingestão de bebidas alcoólicas:  
( ) Diariamente ( ) Ocasionalmente ( ) Não ingere
8. Possui alguma dessas alterações respiratórias?  
( ) Rinite ( ) Sinusite ( ) Asma / bronquite
9. Possui alguma alteração sistêmica listada abaixo?  
( ) Alterações / doenças gastrointestinais  
( ) Alterações / doenças pulmonares  
( ) Alterações / doenças hepáticas  
( ) Alterações / doenças renais  
( ) Diabetes
10. Sente saber amargo ao acordar? ( ) sim ( ) não
11. Sente sabor amargo durante o dia? ( ) sim ( ) não
12. Dos seguintes alimentos, quais consome mais que uma vez por semana?  
( ) Alho ( ) cebola ( ) pimenta ( ) repolho ( ) rabanete
13. De quanto em quanto tempo costuma se alimentar?  
( ) A cada 03 horas ( ) Intervalos maiores que 3 horas
14. Tem sensação de boca seca? ( ) sim ( ) não
15. Frequência de escovação diária:  
( ) 0 ( ) 1 vez ( ) 2 vezes ( ) 3 vezes ( ) mais que 3 vezes
16. Meios para higiene oral:  
( ) Escova ( ) creme dental ( ) fio dental ( ) palito
17. Escova / higieniza a língua? ( ) sim ( ) não
18. Usa algum antisséptico bucal? ( ) sim ( ) n

**APÊNDICE C - EXAME CLÍNICO**

- Placa dental visível?           ( ) sim ( ) não  
Cálculo dental visível?       ( ) sim ( ) não  
Saburra lingual?               ( ) sim ( ) não  
Dentes ausentes?               ( ) sim ( ) não  
Dentes cariados?               ( ) sim ( ) não  
Fatores retentivos de placa? ( ) sim ( ) não  
Uso de prótese fixa ou móvel? ( ) sim ( ) não

**Quanto ao exame Periodontal:**

- Periodontite?                   ( ) sim ( ) não  
Gengivite?                      ( ) sim ( ) não

**Quanto ao Teste Organoléptico de Halitose:**

- ( ) 0 - Ausência de halitose e de qualquer outro odor;  
( ) 1 - Ausência de halitose, porém apresenta odor natural de boca;  
( ) 2 - Halitose da intimidade - perceptível apenas ao se aproximar;  
( ) 3 - Halitose do interlocutor - perceptível na distância de 50 cm (distância média de conversação);  
( ) 4 - Halitose social - perceptível no ar do ambiente em que o portador se encontra;  
( ) 5 – Halitose severa.

**Quanto ao Teste do Halímetro:**

- ( ) 0   ( ) 1   ( ) 2   ( ) 3   ( ) 4   ( ) 5

**Quanto ao teste do Fluxo Salivar:**

- ( ) Normal – Produção de 1 ml/min de saliva coletada em 5 min de estimulação.  
( ) Fluxo salivar baixo – Produção de menos de 1 ml/min de saliva.  
( ) Hipossalivação – Volume menor que 0,3 ml/ min de saliva coletada em 5 ml de estimulação mecânica.