

## 1. INTRODUÇÃO

Halitose ou mau hálito é uma condição comumente experimentada pela população em geral e é causa de muito sofrimento para os portadores. É definida como um sinal e/ou sintoma e não como uma doença. Pode estar sinalizando alterações patológicas, variações fisiológicas ou processos adaptativos, representando a forma real da condição. Pode estar indicando sintomas de distúrbios psicogênicos ou distúrbios senso perceptivos, sendo esta a forma imaginária da condição. Apesar da halitose real ter causas multifatoriais e sítios sistêmicos de origem, como as alterações de vias aéreas superiores, distúrbios do metabolismo, lentidão ou falência de órgãos, ingestão de alimentos e/ou medicamentos aromáticos, estima-se que entre 80 a 90 % das causas de halitose são oriundas da cavidade bucal (DELANGHE, BOLLEN, DESLOOVERE, 1999).

A língua devido à sua localização e funções é uma das mais importantes estruturas anatômicas da cavidade bucal e nos últimos anos o número de trabalhos enfocando a relação entre a saburra lingual, que é um material mucoso, de coloração variável, aderido ao dorso da língua e formado por células epiteliais descamadas, células sanguíneas, metabólitos, nutrientes, restos alimentares e bactérias (YAEGAKI e SANADA, 1992 a), e halitose vem aumentando e conseqüentemente o interesse científico no estudo da microbiota alojada nessa estrutura. O desenvolvimento de uma microbiota predominantemente anaeróbica associada com a saburra lingual tem sido considerado como um micro ambiente ideal para a produção de compostos odoríferos, que podem comprometer o hálito.

A produção bucal de compostos odoríferos ou odorivetores malcheirosos, que são moléculas de baixo peso molecular e voláteis, que conseguem sensibilizar as células olfativas, está associada com degradação metabólica bacteriana e que ocorre nas superfícies orais, em bolsas periodontais e especialmente no dorso lingual. Esses produtos resultam da fermentação microbiana de proteínas, peptídeos e mucina encontrados na saliva, sangue, fluido gengival, neutrófilos lisados, células epiteliais descamadas e qualquer resíduo de alimento retido nas superfícies bucais (LOESCHE e KAZOR, 2002). Dentre os compostos odoríferos são conhecidos

os Compostos Sulfurados Voláteis (CSV), como o sulfeto de hidrogênio, a metilmercaptana e o dimetilsulfeto. Diaminas menos voláteis, como putrescina e cadaverina, são sugeridas como possíveis participantes odoríferos da halitose (GOLDBERG et al., 1994; KOZLOVSKY et al., 1994). Esses últimos compostos juntamente com ácidos orgânicos de cadeia curta, como ácidos valérico, butírico e escatol são conhecidos como Compostos Orgânicos Voláteis (COV).

Essa investigação *in vitro* teve como propósito estudar as bases biológicas da formação da halitose, abordando o mecanismo das bactérias utilizando substrato adequado e produzindo uma gama variada de compostos odoríferos, através da identificação bacteriana de uma amostra do dorso lingual, seu cultivo anaeróbico em meio enriquecido com diferentes substratos, a produção de gases e a avaliação da fase aérea do cultivo por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM).

## 1.1 Objetivo Geral

Avaliação da produção de compostos odoríferos a partir de microrganismos da saburra lingual.

## 1.2 Objetivos Específicos

1. Cultivar (*in vitro*) a microbiota de dorso lingual envolvida na produção de compostos odoríferos;
2. Identificar as bactérias da amostra pelo método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*;
3. Identificar e quantificar os compostos produzidos pela microbiota incubada, através do sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massas;
4. Correlacionar o tipo de composto produzido pela amostra bacteriana com a adição de diferentes aminoácidos ao meio de cultura.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOTA BUCAL E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS

ALLEN em 1896 afirmou que os principais fatores para o hábito ofensivo são originados a partir da estagnação salivar e presença de restos alimentares na cavidade bucal (SULSER, LESNEY, FOSDICK, 1940; SPOUGE, 1964). Revisando a literatura sobre o assunto, PRINZ (1930) afirmou que o mau odor oral é devido à fermentação de restos alimentares por organismos diminutos – as bactérias.

SULSER, BRENING, FOSDICK (1939) enfatizaram que o processo de putrefação que ocorre com a saliva estagnada, dentes cariados, piorrêa e células degeneradas na língua gera a produção de substâncias odoríferas e pode comprometer o hálito.

A degradação de proteínas pode acontecer por várias vias. No entanto, no corpo é provável que ocorra somente através da ação de enzimas proteolíticas e putrefativas. Sabe-se que certas enzimas proteolíticas podem ocorrer naturalmente no corpo, mas na boca a maioria das enzimas, tanto proteolíticas como putrefativas são derivadas de bactérias. Certas bactérias, incluindo algumas que são habitantes naturais da boca, possuem enzimas proteolíticas e sob certas condições podem hidrolisar e degradar proteínas. Entre os organismos que possuem esta propriedade estão *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus proteus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus sporogenes*, *Bacillus histoliticum*, bacilo do cólon, bacilo *Melaninogenicum* e *Clostridium* e *Treponema mucosum* (LAW, BERG, FOSDICK, 1943).

Durante a década de 40, uma série de investigações sobre mau odor foi conduzida utilizando saliva. Em uma delas encontramos a primeira tentativa de identificar as bactérias envolvidas na formação de compostos associados com mau hálito. Assim, BERG e FOSDICK (1946) estudaram o efeito de 17 diferentes microrganismos bucais, entre eles leveduras, *Sarcina lutea*, *Streptococcus viridans*, *B. subtilis*, *Gaffkya tetragena*, *Lactobacillus acidophilus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Streptomyces citreus*, *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter aerogenes*, *Neisseria catarrhalis* e os gêneros *Leptothrichia* e *Actinomyces*, sobre a taxa de putrefação da saliva e proteínas salivares. Aproximadamente 300 c.c. de saliva

foram obtidos de vários indivíduos e divididos em 3 porções iguais, sendo 2 porções esterilizadas e a terceira não. Os microrganismos foram isolados a partir da saliva ou de raspagem dos dentes, cultivados em meio ágar preparado em jarras, sob condições aeróbicas e anaeróbicas e identificados pelos métodos usuais. Suspensão bacteriana foi adicionada aos frascos salivares. Os autores verificaram através do osmoscópio que, tanto na saliva incubada aeróbica quanto anaerobicamente, os odores foram produzidos muito rapidamente. Reconhecendo as diferenças que existem entre seu estudo *in vitro* e as condições da cavidade oral, os autores concluíram que praticamente todos os microrganismos estudados poderiam desempenhar um papel na putrefação das proteínas salivares, sendo que a microbiota mista produz mais rapidamente essa putrefação do que qualquer espécie sozinha. SHIOTA e KUNKEL (1958) em trabalho *in vitro* similar concordaram que a capacidade para produzir mau odor reside na microbiota bucal, pois saliva livre de bactérias não produziu odor em seu experimento.

Em 1972, McNAMARA, ALEXANDER e LEE investigaram criticamente o papel dos microrganismos orais na produção do mau odor. Em 20 homens saudáveis foi coletada a medida de 20 mL de saliva estimulada com parafina dentro de um frasco de vidro esterilizado. A saliva foi incubada a 37°C por 4 a 24 horas para simular estagnação salivar e caldo de cultura foi inoculado com saliva ou culturas estoque de organismos selecionados. O efeito dos carboidratos sobre produção de odor foi verificado utilizando-se glicose. O pH do meio foi mantido entre 6,5 e 7,5. Coloração de Gram foi utilizada para verificar a taxa de organismos Gram-positivos e Gram-negativos. O odor resultante foi caracterizado organolepticamente para determinar se era semelhante ao odor pútrido típico do mau odor bucal. Não houve quantificação da intensidade do odor produzido, os juízes de odor determinaram qualitativamente a presença ou ausência do odor. Os autores concluíram que existe uma relação positiva de causa e efeito entre a presença de microrganismos salivares e a produção de mau odor. As amostras livres de bactérias não produziam mau odor. Das 14 espécies de microrganismos bucais usadas como inóculos para o meio líquido os 9 microrganismos Gram-positivos *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *S. aureus*, *Diplococcus*

*pneumoniae* e *Candida albicans* não produziram odor. Os 5 restantes, sendo 4 Gram-negativos (*Fusobacterium polymorphum*, *Veillonella alcalescens*, *Bacteroides fundiliformis* e *Klebsiella pneumoniae*) e um Gram variável do gênero *Leptothrichia* produziram odor desagradável. Assim mudança de Gram-positivos para Gram-negativos que ocorreu na saliva estagnada foi acompanhada de odor pútrido. Nos tubos com pH 6,5 não houve produção de odor, já nos tubos com pH 7,2 houve produção de odor. Com adição da glicose não ocorreu formação de odor. PIANOTTI e PITTS (1978) comprovaram os achados do trabalho anterior quando diminuíram o número de anaeróbios Gram negativos e o mau odor bucal, após o uso de um antisséptico bucal. Os autores sustentam que a redução no número de bactérias dos gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides* melhora o mau odor.

Em 1979, SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, estudaram o papel de microrganismos bucais na formação dos componentes odoríferos associados com mau odor bucal. Oito espécies Gram-positivas e quatro espécies Gram-negativas foram incubadas individualmente, em condições anaeróbicas por 3 ou 24 horas a 37°C em um sistema de saliva esterilizado com adição de cisteína como substrato. Análises de cromatografia gasosa foram conduzidas. Os resultados mostraram, que somente os organismos Gram-negativos *V. alcalescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides melaninogenicus* e *K. pneumoniae* produziram compostos odoríferos de enxofre. Os autores concluíram que os microrganismos orais desempenham um papel importante na produção de odor.

TONZETICH e McBRIDE (1981) estudaram duas estirpes bacterianas bucais de *B. melaninogenicus*, uma estirpe não patogênica *var melaninogenicus* (CP-) e a estirpe patogênica *B. melaninogenicus asaccharolyticus* (CP+) e sua capacidade de produção de CSV através de análises com cromatografia gasosa. A espécie CP+ produziu maiores quantidades de CSV quando comparada à espécie CP-. Esses resultados sugerem que a análise da produção de compostos odoríferos oferece um meio conveniente de avaliar espécies bacterianas diferentes e o potencial patogênico de *B. melaninogenicus*.

MINK et al. (1983) evidenciaram a capacidade de *F. nucleatum* e outras espécies anaeróbicas bucais em produzir CSV. Após crescimento

bacteriano adequado, em *Peptone Yeast Extract Medium*, o headspace da cultura foi analisado por cromatografia gasosa. Os resultados demonstraram que membros do gênero *Fusobacterium* e microrganismos espiroquetas produzem níveis maiores de CSV do que outros gêneros bacterianos não *Treponema* analisados.

PIANOTTI, LACHETTE, DILLS (1986) em estudo *in vitro* afirmaram baseados em testes químicos que a bactéria *F. nucleatum* está envolvida na produção de compostos da halitose.

PERSSON, CLAESSON e CARLSSON (1989) estudaram a capacidade da microbiota subgingival em produzir CSV. Amostras bacterianas das bolsas periodontais (7-12 mm) de 9 pacientes foram incubadas por 7 dias a 37°C, sob condições de anaerobiose em um frasco de vidro, em soro humano inativado e os CSV formados avaliados através de cromatografia gasosa. Os autores observaram que a microbiota subgingival é capaz de produzir CSV.

Um total de 163 estirpes bacterianas (91 das bolsas periodontais, 64 coleções referência e 8 isolados clínicos) foram testadas em sua habilidade de formar CSV a partir do soro e em solução salina enriquecida com L-cisteína e L-metionina, cultivados em condições de anaerobiose e identificados por cultura e testes bioquímicos, por PERSSON et al. (1990). Os resultados da cromatografia gasosa destacaram como potentes produtores de compostos odoríferos as bactérias *Treponema denticola* e *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides loescheii*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*. Na solução enriquecida com L-cisteína sulfeto de hidrogênio foi formado por todas as 163 estirpes bacterianas, destacando-se membros do gênero *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium*, que produziram grandes quantidades do gás.

GREENMAN, SPENCER, MCKENZIE (2002) estudaram a produção de CSV através do monitor de sulfetos Halimeter® a partir de *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *F. nucleatum* que foram encubadas anaerobicamente por 24 horas a 37°C. *F. nucleatum* sempre foi dominante e *P. gingivalis* esteve presente como um componente menor nesta produção.

SREENIVASAN em 2003 estudou as bactérias odorigênicas produtoras de sulfeto de hidrogênio, utilizando um meio ágar com acetato de chumbo, conhecido como OHO (*Oral Hydrogen sulfide-producing Organisms*), como indicador para identificar as colônias pretas ou marrons no ágar. Este meio suporta o crescimento de membros comuns da microbiota oral e colônias bacterianas que não produzem o sulfeto de hidrogênio aparecem pálidas. As amostras salivares coletadas no estudo foram inoculadas no meio e as colônias negras e/ou marrons contadas por exame visual após a incubação. As bactérias que produzem estas colônias no meio OHO incluem membros dos gêneros: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* entre outras.

## 2.2 MICROBIOTA DA SABURRA E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS

Ainda em 1933, GRAPP associou halitose com saburra lingual, pois de 500 pessoas com halitose estudadas, 90% delas possuíam saburra lingual. O autor mostrou que os 2/3 posteriores da língua foram responsáveis pelo mau odor.

Os primeiros a analisar a microbiota da língua (nota-se que não estudaram halitose) foram GORDON e GIBBONS em 1966 e eles identificaram várias bactérias anaeróbicas entre a microbiota cultivável, como os gêneros *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* (GOLDBERG et al., 1997; ROSENBERG, 2003).

Desenvolvendo um raciocínio lógico entendemos porque a língua por si só, com seus nichos anatômicos (fissuras, criptas, grande número de papilas linguais) cria um ambiente onde os microrganismos são protegidos da limpeza fisiológica salivar e onde os níveis de oxigênio são baixos, favorecendo o desenvolvimento da microbiota anaeróbica. É neste ambiente que observamos a formação da saburra lingual, que é um material mucoso, de coloração variável (dependente principalmente da dieta do hospedeiro) aderido ao dorso lingual e formado por células epiteliais descamadas, células sanguíneas, metabólitos, nutrientes, restos alimentares e as bactérias (YAEGAKI e SANADA, 1992 a). Tem sido descrito que mais de 100 espécies bacterianas



podem estar ligadas a uma única célula epitelial descamada do dorso lingual, enquanto aproximadamente somente 25 espécies bacterianas podem ligar-se a uma célula descamada em outro sítio da cavidade oral (YAEGAKI e COIL, 2000). Além da anatomia da língua, fatores como idade, higiene bucal, taxa de fluxo salivar e condição periodontal influenciam a composição da saburra lingual (YAEGAKI e SANADA, 1992 b; ROLDAN, HERRERA, SANZ, 2003).

A saburra lingual tem sido classificada em diferentes escores pelo uso de alguns índices. MIYAZAKI et al., 1995 classificaram a saburra lingual como presente ou ausente em 3 áreas, não citando a espessura desta. WINKEL et al., 2003 dividiram a língua em 6 áreas (3 na parte posterior e 3 na parte anterior da língua), classificando cada uma independentemente, segundo os escores: 0 (ausência de saburra), 1 (saburra leve) e 2 (saburra espessa). O valor final do Índice de saburra de Winkel é obtido pela soma de todos os escores que fica entre 0 a 12. OHO et al., 2001 e TANAKA et al., 2004 classificam a saburra lingual multiplicando o escore de espessura pelo escore da área. A área é registrada visualmente com escores de 0 a 3 (0=sem saburra; 1=saburra cobrindo menos do que  $\frac{1}{3}$  do dorso lingual; 2=saburra cobrindo de  $\frac{1}{3}$  a  $\frac{2}{3}$  do dorso lingual; 3=saburra cobrindo mais do que  $\frac{2}{3}$  do dorso lingual). A espessura foi registrada visualmente com escores de 0 a 3 (0=sem saburra; 1=fina saburra com papilas linguais visíveis; 2=saburra moderada com metade das papilas linguais invisíveis; 3=saburra espessa com papilas linguais totalmente invisíveis).

Conhecendo a importância da saburra lingual na formação do mau hálito e observando que esta microbiota da saburra não era conhecida, De BOEVER e LOESCHE em 1995 tentaram identificá-la. Assim, 16 pessoas com queixa de halitose participaram deste estudo. Foram realizados exames dentais, testes para medida dos odores bucais (Halimeter® e organoléptico) e testes microbiológicos, sendo BANA (*N-benzoil-DL-arginine-2-naphthamide*) e cultura de amostras da saburra lingual (incubadas a 35°C por 7 dias sob condições anaeróbicas). Através do teste BANA e evidências de formação de indol eles identificaram colônias representativas de Bacteróides pigmentados de negro, como *Prevotella melaninogenica*, *P. gingivalis* ou *P. intermedia*. Utilizaram coloração de Gram e outros testes bioquímicos para complementar as identificações. Os autores concluíram que bactérias BANA positiva na

língua, saburra lingual e fissuras são todos associados com mau odor oral e parecem ser fatores importantes no processo de halitose. Mau odor oral foi significativamente correlacionado com odor da língua e quantidade de saburra lingual. A presença de saburra foi relacionada com a carga bacteriana da língua. Os achados suportam a idéia de que a microbiota Gram-negativa anaeróbica e assacarolítica desempenha um papel essencial na formação de mau odor.

QUIRYNEN et al. (1999) estudaram a produção de CSV (Halimeter®) em amostras de língua, tonsilas e faringe de 10 pacientes que procuraram tratamento de halitose, sendo esta confirmada por escores organolépticos  $\geq 2$ . Incluíram no estudo avaliações dos CSV a partir de culturas puras de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*. Realizaram 3 experimentos: no primeiro utilizaram as amostras orais que foram inoculadas em 3 diferentes caldos: caldo infuso cérebro coração (BHI) Oxoid, caldo Columbia (COL) Oxoid e *trypticase soy* (TS) BBL. Foram inoculadas também em 3 diferentes ágar (BHI agar, Oxoid; COL agar, Oxoid e TS agar, BBL). As culturas foram incubadas sob condições anaeróbicas. No segundo experimento realizaram diluições de amostras linguais em 10 e 100 vezes e então inoculadas em caldo BHI e incubadas anaerobicamente. No terceiro experimento as culturas puras foram inoculadas em placas de ágar sangue, anaerobicamente por 2 dias. Os autores concluíram que as amostras do experimento 1 tiveram uma produção significativamente maior de CSV (500 ppb) durante as primeiras 6 horas em caldo (BHI, COL e TS) do que quando incubados em meio ágar (300 ppb). Medidas das culturas puras mostrou uma produção máxima de CSV (450 ppb) 6 horas depois da incubação no caldo BHI.

MORITA e WANG (2001) estudaram 81 pacientes periodontais e mediram a presença de *P. gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (hoje *T. forsythia*, segundo TAUBMAN et al., 1992) e *T. denticola* em amostras da superfície do dorso lingual utilizando o teste BANA, o volume de saburra e as condições periodontais foram medidas para todos os dentes. Avaliaram o mau odor através do Halimeter® e medidas organolépticas para as correlações. Os resultados indicaram que halitose estava primariamente associada com o volume da saburra e inflamação gengival.

ROLDÁN, et al. (2003) testaram o efeito de um enxaguatório bucal sobre a microbiota de 40 pacientes com halitose. Diferentes amostras microbiológicas de placa subgengival, saburra lingual e saliva não estimulada foram coletadas e processadas seguindo um mesmo protocolo. Foram identificados: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *Micromonas micros*, anteriormente conhecido como *Peptostreptococcus micros* (TAN, SONG, ONG, 2001; DZINK, SOCRANSKY, HAFFAJJE, 1988), *Campylobacter rectus* e *F. nucleatum* baseado primariamente na morfologia da colônia e confirmado usando diferentes testes bioquímicos. Os autores observaram altas prevalências para *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* nas amostras de saburra lingual.

Em 2003, KAZOR et al. afirmaram que, embora as bactérias do dorso lingual sejam relacionadas como o principal fator causador na produção de mau odor em indivíduos com halitose, a composição bacteriana do dorso lingual ainda não havia sido caracterizada. Os autores trabalharam com a diversidade da população bacteriana do dorso lingual em 6 indivíduos saudáveis com queixa de halitose e 5 controle. Analisaram amostras do dorso lingual para definição da microbiota, utilizando o teste BANA e técnicas moleculares por PCR. Amostras foram coletadas através de raspagem da superfície lingual, da área da papila valada à borda anterior da língua com um depressor de língua de madeira esterilizado. Pelos resultados, o dorso lingual possui uma microbiota única: aproximadamente 1/3 da população bacteriana foi encontrada somente na língua e não dentro ou na superfície de outros sítios orais. Identificaram nos indivíduos sem halitose: *S. salivarius*, *Rhothia mucilaginosa* e uma espécie não identificada de *Eubacterium*. Nos indivíduos com halitose: *Atopobium parvulum*, *Dialister sp*, *Solobacterium moorei*, *Eubacterium sulci*, *Fusobacterium periodonticum*.

Em 2004, TANAKA et al. estudaram a contribuição de patógenos do dorso lingual na origem da halitose. Utilizaram um método específico altamente sensível à base de PCR em tempo real para determinar a proporção dos 5 patógenos periodontais anaeróbios (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *T. denticola*) sendo as amostras do material da língua coletadas com espátulas esterilizadas, seguido pela imediata suspensão em meio PBS. Participaram do estudo 29 indivíduos com halitose e 10 indivíduos

sem halitose. Os resultados mostraram que somente *T. forsythia* teve altas proporções nos indivíduos com halitose quando comparado com os indivíduos controle.

KATO et al. (2005) descreveram um método usando Taq Man PCR para a quantificação dos microrganismos associados com mau odor oral, incluindo: *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* e *T. denticola* em amostras de saliva, saburra (inicialmente removeram a saliva do dorso lingual com um jato de ar e depois coletaram a amostra deste local com um cotonete esterilizado na porção posterior da língua) e placa subgengival de 22 pacientes de uma clínica de halitose. Os resultados evidenciaram que o método conseguiu realizar a análise quantitativa dos espécimes. Nas amostras de saburra e saliva encontraram porcentagens de pouca variação entre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. denticola*. Não detectaram *T. forsythia* nestas amostras.

Ainda em 2005, WASHIO et al. aplicaram o método microbiológico do acetato de chumbo, com o objetivo de isolar e identificar as bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio da saburra lingual utilizando métodos biológicos moleculares, como PCR e sequenciamento de DNA, determinando qualquer relação entre o número ou tipo dessas bactérias e mau odor oral. Foram selecionados para o estudo 10 indivíduos com queixa de halitose. Medidas de mau odor bucal, registros da espessura e extensão da saburra lingual foram realizados. As amostras da saburra lingual foram coletadas firmemente (10x) com palitos de dentes esterilizados numa área de 1 cm<sup>2</sup> predeterminada com um papel esterilizado perfurado com esse diâmetro na porção posterior lingual. Foi utilizado *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) contendo 0,05% L-cisteína, suplementado com 5% de sangue de coelho, 0,12% de glutatona e 0,02% de acetato de chumbo. No controle não adicionaram o acetato de chumbo. O conjunto foi incubado a 37°C por 2 semanas em uma câmara de anaerobiose. As bactérias formadoras de colônias pretas ou verdes foram selecionadas como fenótipos produtores de sulfeto de hidrogênio. O número de bactérias total e bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio no grupo com halitose foi significativamente maior do que no grupo sem halitose. As bactérias formadoras de colônias pretas ou verdes foram subcultivadas, confirmando-as como produtoras de sulfeto de hidrogênio e identificadas de acordo com seqüenciamento genético. Os resultados ainda mostraram que

*Veillonella*, *Actinomyces* e *Prevotella* foram predominantes produtores de sulfeto de hidrogênio em ambos os grupos. Os autores concluíram que as bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio da saburra lingual parecem causar pouca halitose nos indivíduos sem doença periodontal, sendo as bactérias principalmente espécies comensais da cavidade oral como as do gênero *Veillonella* e *Actinomyces*.

DONALDSON et al. (2005) estudaram a microbiota presente no dorso lingual de pacientes com e sem halitose usando métodos de cultura microbiológica convencional. Foram selecionados 21 indivíduos com halitose e 20 indivíduos controle. Amostras foram coletadas da parte anterior até parte posterior do dorso lingual utilizando uma escova esterilizada, e sofreram misturas e diluições e então colocadas em *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) e FAA enriquecido com vancomicina. Esses foram incubados sob condições anaeróbias por 10 dias a 37°C. Os anaeróbios estritos foram identificados pela sensibilidade ao metronidazol e as bactérias foram identificadas a nível de Gênero por uma combinação de morfologia da colônia, coloração de Gram, testes bioquímicos e enzimáticos (rapid ID 32A). Foi possível encontrar como gêneros predominantes no grupo teste e controle *Veillonella*, *Prevotella* e *Fusobacterium*. A maior diversidade foi encontrada no grupo halitose, se comparado com controle. As amostras de halitose tiveram um aumento na incidência de bastonetes Gram-negativos não identificáveis, bastonetes Gram-positivos e cocobacilos Gram-negativos. Os autores concluíram que não houve uma associação óbvia entre halitose e qualquer gênero específico bacteriano. A diversidade aumentada de bactérias nas amostras de halitose sugere que halitose pode ser o resultado de interações complexas entre vários gêneros bacterianos. O papel de bactérias não cultiváveis pode também ser importante como contribuinte nesse processo.

Em 2006, FAVERI et al. descreveram a composição bacteriana do dorso lingual antes e após um período sem higiene bucal. Dez voluntários saudáveis sistemicamente, com boas condições bucais e sem halitose, participaram do estudo, e foram instruídos a não realizar a higiene lingual por 7 dias, seguido por um período de 3 dias sem nenhum tipo de higiene bucal. Amostra de saburra lingual foi coletada com uma cureta Gracey, Hu-Friedy em somente 1 movimento, da região posterior à anterior, no dia 0 e com 10 dias, e

a identificação microbiológica foi feita através do emprego da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os resultados mostraram que *P. melaninogenica* e *Veillonella parvula* foram prevalentes tanto no início quanto aos 10 dias do estudo. A média da contagem bacteriana total aumentou significativamente durante o estudo. Proporções dos complexos vermelho e azul aumentaram e mais 18 espécies após o período de acúmulo de saburra lingual, entre elas, vários patógenos periodontais, como *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *P. melaninogenica*. Os autores concluíram que a superfície lingual pode ser um importante reservatório para os patógenos periodontais, pode ter algum papel na recolonização das superfícies dentárias e na etiologia da halitose oral.

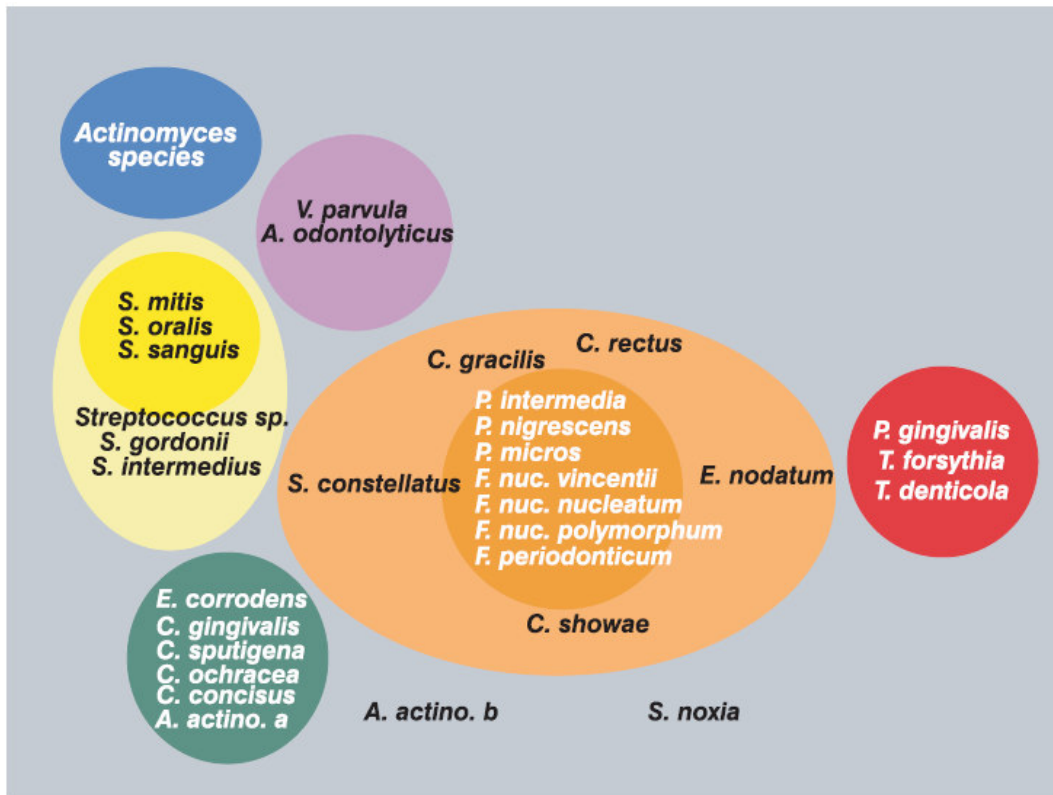
Se na saburra lingual, bactérias de outros nichos orais podem ser isoladas incluindo os patógenos periodontais, isto torna a língua um possível reservatório para a recolonização bacteriana após o tratamento periodontal. Assim, faz-se importante incluir na revisão da literatura, os fundamentos da doença periodontal e a importância dos complexos microbianos na saúde e doença.

### 2.3 DOENÇA PERIODONTAL, INTERAÇÕES E COMPLEXOS MICROBIANOS

A doença periodontal é a infecção mais comum no ser humano sendo caracterizada pela destruição inflamatória dos tecidos de proteção e sustentação do dente em resposta às bactérias encontradas na placa subgingival (GROSSI, 2007). A placa dental (supra e subgingival) é um biofilme microbiano. As bactérias nessas colônias microbianas aderem entre si ou a outras colônias ou interfaces; nesse último caso, à superfície dental, que não descama. SOCRANSKY et al. (1998) descreveram a organização do biofilme da placa dental como aglomerados de “complexos microbianos”. As espécies microbianas na placa dental parecem existir em comunidades que se relacionam entre si de forma específica. A análise de dados relativos ao agrupamento e organização de comunidades, provenientes de 13.321 amostras de placa subgingival de 185 pacientes adultos com doença periodontal, através do método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e de técnicas adequadas para a análise de associações interbacterianas

(coagregações) revelou a presença de 6 grupos bacterianos intimamente correlacionados que foram agrupados e receberam nomes por cores. O grupo azul é constituído por *Actinomyces*, o complexo amarelo é formado por *Streptococcus* (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *S. intermedius* e *Streptococcus oralis*), o complexo verde compreende *Eikenella corrodens*, 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*) junto com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a, antes denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (NORSKOV-LAURITSEN e KILIAN, 2006) sorotipo a (este sorotipo é associado, nos EUA, com a periodontite crônica, enquanto o sorotipo b é relacionado com a periodontite agressiva). O complexo roxo é formado por *Actinomyces odontolyticus* e *V. parvula*. Esses complexos amarelo, azul, verde e violeta teriam a capacidade de aderir à superfície dental, sendo os colonizadores primários da superfície dentária e o seu crescimento em geral precederia a multiplicação da microbiota predominantemente Gram-negativa dos complexos laranja e vermelho (FIGURA 1). Esses complexos basais fornecem receptores e criam condições ecológicas para a implantação das bactérias do complexo laranja. O complexo laranja é formado pelas subespécies de *F. nucleatum* (*F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss polymorphum*, *F. nucleatum ss vincentii*), *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *M. micros*, *Campylobacter showae*, *C. rectus*, *Campylobacter gracilis*, assim como *Eubacterium nodatum* e *S. constellatus*, implicadas com a patogênese das doenças periodontais. O complexo laranja precede e cria condições para a implantação do complexo vermelho formado por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, espécies aceitas como agentes etiológicos da periodontite crônica, relacionados com o aumento da profundidade e sangramento à sondagem. Essa comunidade estava estreitamente relacionada ao “complexo laranja”. O *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não ocorreu em nenhum complexo (FIGURA 1).

FIGURA 1 - COMPLEXOS MICROBIANOS NOS BIOFILMES SUBGENGIVAIS



FONTE: SOCRANSKY et al., 1998 (adaptado).

Atualmente estima-se que aproximadamente 700 espécies bacterianas habitem a cavidade bucal (KAZOR et al., 2003). A maioria parece ser comensal e apenas um pequeno número compreende patógenos oportunistas.

Para ser reconhecido como periodontopatogênico, o microrganismo deve apresentar os seguintes requisitos: a) associação com sítios de destruição ativa em maior número e mais frequentemente do que nos sítios saudáveis ou nos inativos; b) a eliminação do patógeno por medidas terapêuticas deve ser acompanhada de cura ou remissão da doença; c) resposta imunitária por parte do hospedeiro contra o microrganismo e seus produtos; d) elaboração de fatores demonstráveis de virulência (De LORENZO e MAYER, 2004). Na década de 70, de forma pioneira, trabalhos mostraram uma forte associação entre a presença do *A. actinomycetemcomitans* e a Periodontite Agressiva Localizada anteriormente classificada como Periodontite Juvenil (SLOTS, 1976; TANNER et al., 1979). Este microrganismo é um Gram-negativo reto ou encurvado, com extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo. É a única



espécie bucal que elabora leucotoxina, provavelmente seu principal fator de virulência. Fora do ambiente bucal, associa-se com *Actinomyces israelii* na etiologia de lesões actinomicóticas e também foi descrita como causadora de endocardite infecciosa, abscessos cerebrais e subcutâneos, osteomielite e otite média (De LORENZO e MAYER, 2004). Hoje a eliminação ou redução deste microrganismo faz parte da abordagem terapêutica no tratamento desta forma de doença. O *P. gingivalis* é um bacilo Gram-negativo anaeróbio estrito assacarolítico. Suas colônias desenvolvem pigmentação negra. Possui fímbrias com as quais adere às células epiteliais. Foram descritos cinco tipos antigênicos e genotípicos de fímbrias. Produz proteases, como a colagenase e fosfolipase A, sendo considerada a mais proteolítica dentre as bactérias Gram-negativas da boca e produzir intensa destruição tecidual (MIHARA e HOLT 1993) e está fortemente associado com o início e progressão das lesões de periodontite crônica (TAKEUCHI et al. 2001). Além da placa subgingival associada a casos de periodontite, também é associado com infecções mistas com *A. israelii* (De LORENZO e MAYER, 2004). Existe um crescente interesse sobre o papel de *T. forsythia* na etiopatogenia da periodontite crônica. Em alguns estudos houve correlação entre o aumento da profundidade de sondagem e contagens do microrganismo (TAN, SONG, ONG, 2001; TSAI et al., 2003). Nos últimos anos, certos microrganismos do tipo espiroquetas tem sido relacionados à periodontite crônica, principalmente *T. denticola*. Como *P. gingivalis* e *T. forsythia*, esse patógeno tem sido encontrado com maior freqüência em sítios periodontalmente doentes do que em sítios saudáveis, na placa subgingival do que na supragingival (RIVIERE et al., 1992; PASTER et al., 2001).

Outros microrganismos também parecem desempenhar papel importante na etiopatogenia da doença periodontal, apesar de que esse papel não está tão claro quanto para as espécies descritas acima (CHOI et al., 2000; MOMBELLI, CASAGNI, MADIANOS, 2002). Entre eles destacam-se *P. intermedia* (VAN WINKELHOFF et al., 2002; HAFFAJJE et al., 1992), *F. nucleatum* (VAN WINKELHOFF et al., 2002; DZINK, SOCRANSKY e HAFFAJJE, 1988), *C. rectus* (RAMS, FEIK e SLOTS, 1993; TANNER et al., 1987), *Eikenella corrodens* (TANNER et al., 1987), *M. micros*, *S. intermedius* (DZINK, SOCRANSKY, HAFFAJJE 1988; WALKER et al., 1993), espécies

*Capnocytophaga* (NONNENMACHER, MUTTERS, de JACOBY, 2001), podendo ser possíveis patógenos periodontais.

#### 2.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Na literatura encontramos várias técnicas de detecção bacteriana. Microscopia, cultura, testes enzimáticos, testes imunológicos, sondas de DNA e detecção por hibridização checkerboard DNA-DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) estão entre as mais utilizadas. Cada uma destas metodologias apresenta limitações, vantagens e desvantagens (LOTUFO, PANNUTI, SARAIVA, 2001). SAVITT et al. (1988) compararam os métodos de cultura e análise de sonda de DNA para detectar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em amostras de biofilme dental subgingival. As amostras foram coletadas de áreas gengivais de pacientes diagnosticados como saudáveis sistemicamente, com evidência de gengivite, periodontite agressiva ou periodontite crônica. O número desses patógenos foi determinado usando meios microbiológicos e testes bioquímicos. Os resultados foram então comparados aos números obtidos da análise de sonda de DNA espécie específica. Em sessenta amostras do grupo de doentes, análise de sonda DNA demonstrou 100% de efetividade na detecção do *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*, além de 91% de efetividade na detecção de *P. gingivalis*. Os testes de sonda do DNA frequentemente identificaram 22 desses patógenos em amostras que foram negativas na cultura. Os resultados sugerem que tecnologicamente a análise de sonda de DNA é superior ao método de cultura para a detecção do *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em biofilme subgingival de humanos.

Técnicas de cultura de bactérias tem sido o método clássico para detecção de microrganismos envolvidos na doença periodontal. Porém, esta técnica envolve procedimentos que podem ser inadequados para o crescimento de algumas bactérias anaeróbias. Este método requer que as amostras sejam imediatamente processadas para aquisição máxima de bactérias sobreviventes. O método é muito trabalhoso e só pode identificar microrganismos junto com testes bioquímicos tais como fermentação de açúcar e análises da atividade enzimática bacteriana (SAVITT et al., 1988). Métodos de cultura anaeróbia são usados para detectar a maioria dos microrganismos

do biofilme dental subgengival e determinar *in vitro* a susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos bucais. Por outro lado, o método de cultura pode apresentar nível reduzido de sensibilidade na detecção de alguns patógenos (BOUTAGA et al., 2003) e a impossibilidade de cultivo de alguns patógenos como *T. forsythia* e a demora na obtenção dos resultados (SAKAMOTO et al., 2002; LOOMER, 2004). As vantagens da cultura são: possibilita contagens relativas e absolutas das espécies e capacidade de avaliar a susceptibilidade a antibióticos (SOCRANSKY et al., 1987). As desvantagens são: 1- crescimento só de bactérias viáveis; 2- rigorosa amostragem; 3- necessidade de condições adequadas de transporte; 4- a sensibilidade da cultura bacteriana pode ser baixa; 5- requer equipamento específico; 6- requer pessoal experiente; 7- é relativamente caro e demorado (SANZ et al., 2004).

Testes enzimáticos foram desenvolvidos para detectar bactérias através de enzimas conhecidas, sintetizadas por elas. Um teste bastante conhecido, o teste BANA, é baseado na detecção de bactérias que possuem a enzima tripsina tais como *T. forsythia*, *T. denticola* e *P.gingivalis* (LOESCHE et al., 1990 a). Quando uma amostra de placa que contém qualquer combinação dessas bactérias é colocada numa tira de papel impregnada com um substrato incolor *N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthamide* (BANA), o substrato de BANA quebra e produz uma cor que vai do azul até a cor preta, cuja intensidade é proporcional ao total da quantidade dos três microrganismos. Este teste é incapaz de avaliar a proporção das três bactérias e nem identificar a presença de outros microrganismos (LOOMER, 2004). A simplicidade, rapidez da resposta e a facilidade de leitura usada fazem deste método de diagnóstico enzimático ideal para uso clínico (LOESCHE et al. 1990 b). A falta de provas clínicas apropriadas para validar a utilidade de seu diagnóstico e seus problemas intrínsecos considerando baixa sensibilidade (*Evalusite®*) e baixa especificidade (*Perioscan®*) associado ao fato de não determinar qual a espécie bacteriana encontrada mostram a baixa confiabilidade do teste (SANZ et al., 2004).

Os testes imunológicos que usam anticorpos que reconhece antígenos bacterianos específicos e a identificação destas reações específicas antígeno-anticorpo permitem detecção de microrganismos alvos (SANZ et al., 2004).

Vários testes estão disponíveis comercialmente, incluindo a imunofluorescência microscópica direta e indireta, *Enzime-linked immunosorbent assay* (ELISA), teste de aglutinação do látex (GREENSTEIN, 1988; LAMSTER et al., 1993). Como vantagens estes métodos apresentam maior sensibilidade e especificidade que a cultura para os microrganismos alvo, baixo custo, são rápidos de realizar, além de serem relativamente quantitativos. Mas os limites de detecção são baixos, podem apresentar reação cruzada entre espécies bacterianas e não permitem avaliação da sensibilidade antimicrobiana (LOOMER, 2004).

As sondas de DNA consistem em seqüências conhecidas de ácido nucléico que são classificados com um marcador colorimétrico radioativo ou enzimático (sonda) que se unem as seqüências complementares de ácido nucléico no microrganismo correspondente. As seqüências das sondas podem ser inteiramente genômicas, seqüências aleatoriamente clonadas do ácido nucléico ou oligonucleotídeos sintéticos (conhecidas como sondas de 16SrRNA). Das três, as sondas de oligonucleotídeos sintéticos são as mais específicas e com menor reatividade cruzada pois são utilizados genes específicos às espécies bacterianas. É mais sensível, mais rápida e com menor custo se comparada à cultura (TSAI et al., 2003). Além disso após a coleta das amostras não é necessário ser processada imediatamente e não precisa da viabilidade dos microrganismos (LOOMER, 2004).

A técnica da detecção microbiana por hibridização checkerboard DNA-DNA foi descrita por SOCRANSKY et al. (1994) e utiliza sondas de DNA marcadas com a molécula não radioativa digoxigenina. Coloca-se, em linhas paralelas em uma membrana de nylon, DNA bacteriano de 28 amostras de biofilme, e duas linhas de DNA controle (misturas das espécies de microrganismos alvos com contagem absoluta de  $10^5$  e  $10^6$ ). Perpendicularmente às linhas, são colocadas 40 sondas de DNA em tampão de hibridização, marcadas com digoxigenina. Após uma lavagem rigorosa, os sinais são detectados utilizando-se anticorpos para digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina e substratos, que podem produzir sinais quimioluminescentes ou fluorescentes. Esses sinais são vistos na intersecção entre linhas e colunas na membrana de nylon, e a intensidade do sinal está relacionada ao número de microrganismos da espécie na amostra. As imagens

podem ser captadas por filme ou sistemas de detecção ligados ao computador. Os sinais podem ser convertidos em contagens bacterianas por comparação com os controles presentes na mesma membrana (FERES e GONÇALVES, 2001; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1999; SOCRANSKY et al., 1994). As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a rápida identificação e quantificação de até 40 espécies bacterianas presentes nas amostras, a identificação de bactérias difíceis de serem cultivadas e o baixo custo.

A PCR é uma técnica molecular utilizada para a replicação do DNA, possibilitando a síntese de várias cópias de uma amostra de DNA, mesmo que muito pequena, em pouco tempo. Largamente utilizada para identificação de amostras bacterianas. Em odontologia, e especialmente na periodontia, a PCR tem sido usada para identificação de periodontopatógenos em espécies subgengivais (SLOTS, ASHIMOTO, FLYNN, 1995) e para desvendar o papel das bactérias específicas na doença periodontal devido à detecção precisa de espécies. Desde 1990, o teste da reação em cadeia da polimerase tem sido usado com alto nível de sensibilidade e tem sido de grande sucesso para identificar periodontopatógenos de biofilme subgengival (WATANABE e FROMMEL, 1993; SLOTS, ASHIMOTO, FLYNN, 1995; ASHIMOTO et al., 1996; KLEIN e GONÇALVES, 2003; LOOMER, 2004).

SANZ et al. em 2004, estudando métodos de detecção de microrganismos afirmaram que não existe um único método de diagnóstico microbiológico que demonstra característica ideal e que a escolha do teste deve ser baseada: 1- na sensibilidade e na especificidade; 2- na disponibilidade e no custo.

Essa microbiota descrita acima pode, degradando material protéico, produzir e liberar compostos odoríferos.

## 2.5 COMPOSTOS ODORÍFEROS

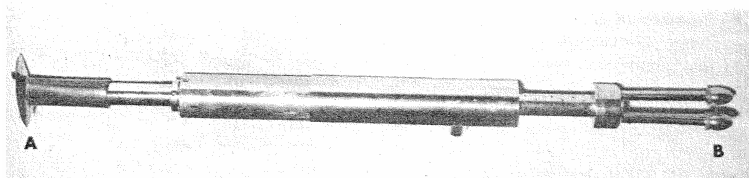
### 2.5.1 Métodos Para Avaliação dos Compostos Odoríferos

#### Osmoscópio

Este aparelho foi desenvolvido em 1934 por FAIR e WELLS para avaliar a intensidade do odor em amostras de água de consumo. Foi modificado e adaptado em 1939 para medidas da intensidade do odor bucal

(BRENING, SULSER, FOSDICK, 1939). Foi o primeiro método científico a avaliar o odor associado com o hálito e foi muito utilizado nos estudos das décadas de 40 e 50. O osmoscópio funciona sob o princípio da avaliação da intensidade dos odores pelo método da diluição do ar, assim quanto mais ar é utilizado para diluir um odor até torná-lo exatamente perceptível, mais intenso é considerado o odor. Pela figura abaixo observamos que o paciente exala o ar bucal na posição A e este ar percorre um tubo de metal perfurado até a posição B, onde o examinador posiciona a narina para o exame (FIGURA 2).

FIGURA 2 - OSMOSCÓPIO



FONTE: POLLACK, 1963.

As perfurações ao longo do tubo permitem a diluição proporcional do ar bucal com o ar do ambiente, movendo a parte externa progressivamente sobre as perfurações até cobri-las (são 6 posições de diluição). O examinador inicia usando a maior diluição possível do hálito (todas as perfurações descobertas) e progressivamente vai cobrindo as perfurações até detectar o mau odor (POLLACK, 1963).

Já foi utilizado juntamente com um crioscópio (condensador com nitrogênio líquido, para captar e condensar o ar coletado) para facilitar a leitura das medidas. O ar condensado passava por um banho de água a 37°C, para volatilizar-se novamente e então introduzido no osmoscópio para as medidas (SPOUGE, 1964). Com o tempo os pesquisadores passaram a usar somente o osmoscópio, dispensando o crioscópio, sem prejuízo dos resultados observados (MORRIS e READ, 1949).

### Organoléptico

O método organoléptico consiste em avaliar o mau odor através do olfato humano. É considerado o “padrão-ouro” para medidas de halitose, segundo ROSENBERG (2003), mas tem suas desvantagens como a

subjetividade e baixa reprodutibilidade inter e intra examinadores, desconforto para paciente e examinador e necessidade de precauções prévias. Os métodos organolépticos descritos na literatura nos fornecem duas dimensões do odor. A primeira é qualitativa ou hedônica, segundo o manual da ASTM (Sociedade Americana para Testes e Materiais) de 1968, e implica na presença ou ausência do odor (GREENMAN et al., 2004). A segunda é semi-quantitativa e neste ponto tem início as diferenciações entre os métodos. Autores como STEENBERGHE e QUIRYNEN da Bélgica, utilizam a técnica organoléptica baseada na origem do odor, dessa forma avaliam o odor da cavidade bucal sem respirar, do fluxo expiratório bucal, do fluxo expiratório nasal, da saliva, da saburra lingual e do biofilme (QUIRYNEN et al., 2003; STEENBERGHE e QUIRYNEN, 2005). Outra técnica é a baseada na intensidade do odor e foi descrita em 1919, utiliza os escores de 0 a 5, onde 5 significa odor extremamente ofensivo (GREENMAN et al., 2004). Esta última técnica voltou a ser utilizada por ROSENBERG et al. (1991a,b), e existem vários autores que a utilizam variando os escores, como OHO et al. (2001) que utilizam a técnica com escores de 0-3. Outros (SHIMURA et al.,1996; SHIMURA et al.,1997) utilizam escore de 0-4, mas todos baseados na intensidade do odor. Outra técnica, desenvolvida no Brasil é baseada no grau de propagação do odor com escala de 0-4 onde: 0=ausência de odor; 1=odor natural; 2=halitose da intimidade (distância de 15 cm); 3=halitose do interlocutor (distância de 50 cm); 4=halitose social (distância de + de 50 cm). O examinador consegue detectar os escores de halitose de forma muito sutil, sem o paciente perceber, durante a conversação (escore 4) e anamnese (escore 3). Se até esse momento o examinador não percebeu nenhum odor, durante o exame clínico (onde paciente/examinador ficam mais próximos na distância de 15 cm) pode perceber e o escore será 2, sendo halitose de pequeno grau de propagação, ou pode anotar os escores 1 de odor natural ou mesmo escore 0, onde não existe nenhum grau de halitose. Este método tem a grande vantagem de ser simples, evitar o constrangimento paciente/examinador, facilitar a comunicação entre examinadores e ser menos subjetivo (FALCÃO e VIEIRA, 2003; VIEIRA e FALCÃO, 2007).

### Monitores Portáteis de Sulfetos

Em 1991, foi introduzido o primeiro monitor portátil de sulfetos, chamado Halimeter® modelo RH-17 (Interscan Corp, Chatsworth, Ca.) que possui um sensor eletroquímico voltimétrico para medidas do ar bucal clinicamente (ROSENBERG et al., 1991a). Este aparelho detecta sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e com menor sensibilidade o dimetilsulfeto (ROSENBERG et al., 1991a; ROSENBERG et al. 1991b). Outros estudos sugerem que mede somente os dois primeiros compostos (QUIRYNEN et al., 2003). As medidas são registradas em ppb (partes por bilhão) e expressam os diferentes graus de halitose. Até 80 ppb = ausência de halitose; de 80 a 100 ppb = odor perceptível, as vezes considerado como halitose; 100 a 120 ppb = halitose moderada; 120 a 150 ppb = halitose mais pronunciada; acima de 150 ppb = halitose severa (TARZIA, 2000).

FIGURA 3 – HALIMETER®



FONTE: a autora (2006)

Atualmente dispomos de outros aparelhos como o Breathtron® (WASHIO et al., 2005), que é um monitor com sensor semicondutor de Óxido de Zinco, que promete medir os 3 compostos de enxofre vistos acima sem, no entanto, distinguir um do outro. O OralChroma® (Ability Corporation, Osaka, Japão) é outro monitor com sensor de Óxido de Índium e destaca-se dos anteriores, pois além de detectar os 3 compostos sulfurados também quantifica cada um deles, por esse motivo é também chamado de aparelho de cromatografia gasosa portátil (VELDE et al., 2007). O Halimeter® continua



sendo o aparelho mais utilizado em pesquisas de halitose, apesar das limitações.

### Cromatografia Gasosa

Técnica extensamente utilizada em vários campos de pesquisa por possibilitar entre outras a separação e detecção de traços de compostos em misturas complexas. Devido a este atributo parece ser bem indicada para análises de ar bucal, e é usada com este fim desde o final dos anos 60 (TONZETICH e RICHTER, 1964). Desde que o sistema de CG identifica qualquer componente volátil do ar, da saliva incubada ou do fluido gengival (GOLDBERG et al., 1994) e, se devidamente equipado, com sensores de chama fotométricos (FPD) pode devido à alta sensibilidade e semi-especificidade detectar compostos sulfurados (TONZETICH, 1971). MURATA et al. (2002) consideram a CG equipada com FPD o “padrão ouro” para medidas de mau odor. AWANO et al. (2002) concordam com os autores acima, particularmente nas avaliações de halitose com propósitos de pesquisa. As principais desvantagens desta técnica são o alto custo do aparelho, das medidas individualmente, necessidade de pessoal treinado para a operação e o tempo necessário para detecção e medidas. Não é um aparelho de uso rotineiro nos consultórios e clínicas de Odontologia, muito pelo contrário é encontrado somente em laboratórios de pesquisa.

#### 2.5.2 Estudos Iniciais dos Compostos

Em 1930, PRINZ em artigo de revisão de literatura sobre o hálito ofensivo e suas causas escreveu que a partir da quebra de debris encontrados na boca formam-se alguns compostos altamente odoríferos como os ácidos oxibutírico, diacético, láctico, propiônico e outros derivados de ácidos graxos. Ainda compostos com cheiro amoniacal, gás do pântano, o altamente ofensivo sulfeto de hidrogênio e o intimamente relatado e que possui odor extremamente penetrante composto metilmercaptana, fruto da degradação protéica.

O grau de putrefação que gera uma marcante produção de compostos como indol, escatol, tiramina, cadaverina, putrescina, mercaptanas e sulfetos pode ser determinado por vários métodos:

- A quantidade de hidrólise pode ser medida pelo método da titulação com formol que determina o número de grupos carboxil livres. Sabe-se que após a proteína ser hidrolisada cada ligação peptídica contém um grupo amino e outro carboxil e se nenhum outro processo químico ocorrer este teste pode indicar a quantidade de hidrólise que ocorre,
- Os produtos finais da putrefação, como indol a partir do triptofano, fenol a partir da tirosina e sulfetos a partir de aminoácidos ricos em enxofre podem ser mensurados pelas reações de descarboxilação, deaminação e óxido-redução,
- Como a putrefação é sempre acompanhada por compostos malcheirosos, é possível medir a concentração de odor com os métodos osmoscópico ou organoléptico.

Uma série de experimentos foi conduzida na década de 40 e 50 utilizando saliva para estudar a taxa de putrefação com os métodos acima, a maioria desses estudos comparando a saliva de pacientes periodontais e não periodontais e a justificativa foi que a doença periodontal era sempre acompanhada por uma concentração de odor altamente pútrida (SULSER, BRENING, FOSDICK, 1939).

Utilizando saliva total estimulada como um meio para produzir odor, um número de mudanças químicas na saliva foram observadas por LAW, BERG, FOSDICK (1943). Sabendo-se que as proteínas deste meio sofrem proteólise, sendo degradadas a peptídeos e aminoácidos, que sendo degradados geram compostos voláteis, que geram o mau odor ao ar bucal os autores realizaram este estudo preliminar sobre a taxa da putrefação das proteínas salivares (titulação) e sobre os odores gerados (osmoscópico). A taxa de putrefação, medido pelo aumento na intensidade do odor foi determinada na saliva de 163 pacientes sem doença periodontal e 145 com doença periodontal. A taxa de hidrólise das proteínas foi medida na saliva de 31 pacientes sem doença periodontal e 40 pacientes com doença periodontal. Trinta c.c. de saliva estimulada com parafina foi obtida e imediatamente incubada a 37°C para os testes. Os resultados mostraram que apesar da saliva dos pacientes com doença sofrerem o processo de putrefação mais rapidamente do que a dos pacientes saudáveis, as variações individuais foram muito marcantes.

CARY (1946) também trabalhando com saliva afirmou que a halitose bucal acontece devido à produção de compostos voláteis através da ação putrefativa de microrganismos. O autor demonstrou, através de métodos químicos, que a decomposição protéica ocorre na saliva total incubada com a produção então de produtos como amônia, sulfetos, indol e ácido láctico.

Em continuação a série de trabalhos com saliva BERG, BURRIL, FOSDICK (1946) estudaram a taxa de putrefação das proteínas salivares através da titulação com formol, detecção de indol (extração com clorofórmio) e sulfetos (reação colorimétrica). O estudo consistiu de 4 grupos, onde foi coletada saliva do Grupo 1 com pacientes sem doença periodontal, Grupo 2 pacientes com doença periodontal leve, Grupo 3 pacientes com doença periodontal moderada e Grupo 4 pacientes com doença periodontal avançada. Os autores observaram uma diferença marcante na taxa de putrefação da saliva dos pacientes com e sem doença periodontal. A produção de indol, sulfetos e odores foi particularmente significativa quando a saliva foi incubada anaerobicamente e na presença da caseína como substrato adicional.

No ano seguinte BERG, BURRIL e FOSDICK (1947), neste novo experimento selecionaram 2 grupos de 100 pacientes cada. No grupo I pacientes sem doença periodontal e no grupo II pacientes com doença periodontal. Trinta e cinco c.c. de saliva estimulada foi coletada de cada paciente e análises da quantidade de hidrólise (titulação com formol), quantidades de indol e sulfetos foram realizadas como no trabalho anterior. A concentração de odor de cada porção salivar foi determinada imediatamente após a abertura dos frascos incubados. Os resultados confirmaram que a saliva dos pacientes periodontais tem taxa de putrefação ocorrendo muito mais rapidamente do que a saliva dos pacientes normais. Houve alta correlação entre os achados radiográficos e clínicos da doença e entre os radiográficos e químicos.

PERSKY e BILLY em 1962 relacionaram indol, escatol e aminas como importantes produtos malcheirosos em culturas bacterianas anaeróbicas, através de métodos químicos.

Os estudos conduzidos até este ponto utilizavam apenas o osmoscópio, métodos organolépticos e extrações com solventes dos compostos odoríferos. Várias tentativas para desenvolver um método analítico

começaram a ser desenvolvidas, não obtendo-se êxito, devido a escassez de conhecimentos para identificar os compostos odoríferos e a indisponibilidade de análises químicas e instrumentais para detectar concentrações muito pequenas das substâncias odoríferas que ocorrem no ar bucal e nos vapores do hálito.

Em meados de 1960 estes problemas foram contornados com a condução de estudos onde os autores concentravam muito a saliva em putrefação e os sistemas de placa bacteriana sendo possível estabelecer uma correlação positiva entre as taxas de intensidade de odor organolépticas já utilizadas e o conteúdo de enxofre do vapor saturado no headspace das amostras de saliva.

### 2.5.3 Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

Inúmeras tentativas de identificação dos compostos odoríferos foram conduzidas por MACKAY, LANG, BERDICK (1959); LARSSON (1965) e outros investigadores empregando unidades de cromatografia gasosa equipadas com detectores de ionização de chama (FID), mas não conseguiram nenhum volátil contendo enxofre. Um passo importante nessa direção foi realizado por BRODY e CHANCY (1966) que desenvolveram um sistema detector de chama fotométrico (FPD), que possui ambos: alta sensibilidade e semi-especificidade para compostos sulfurados.

Baseado nas evidências químicas dos estudos anteriores somadas às observações visualizadas nos seus próprios experimentos (dados não publicados) TONZETICH e RICHTER em 1962, indicaram que os componentes odoríferos da saliva incubada são compostos que contem enxofre, mas não houve identificação desses compostos.

O trabalho de TONZETICH e RICHTER (1964) foi um marco importantíssimo nos estudos de mau odor, sendo as observações descritas contrárias ao conceito tradicional da época de que as aminas, amônia e indol eram os principais responsáveis pelo mau odor. Esses autores conseguiram determinar a concentração dos componentes sulfurados voláteis sulfeto de hidrogênio e mercaptanas na saliva (*in vitro*), utilizando métodos químicos - método das substâncias redutoras de voláteis. Após a adição de alguns

substratos ricos em enxofre foi realizada também avaliação organoléptica, ficando claro o papel dos aminoácidos ricos em enxofre em intensificar o odor.

RICHTER e TONZETICH (1964), com o objetivo de isolar e identificar os compostos de enxofre continuaram os trabalhos com sistema de saliva em putrefação, agora *in vitro* e *in vivo*. Este foi o primeiro trabalho a detectar os compostos sulfurados voláteis, ou CSV, diretamente do ar bucal, mas de forma muito insatisfatória. A leitura (*in vitro*) dos gases foi realizada no espectrômetro de massas (modelo 21-103 C) e em um titulador extremamente sensível, capaz de medir os componentes sulfurados oxidáveis quase que, exclusivamente. Nos estudos *in vivo* utilizaram um aparato (YOKE) introduzido na boca para captar os gases que foram introduzidos no espectrometer de massa. Medidas organolépticas foram realizadas. Os resultados *in vitro* com espectrômetro de massas evidenciaram compostos como: sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e dimetildissulfeto, não observaram aminas nesta amostra. Já os resultados do titulador apontam para metilmercaptana em maior quantidade e traços de sulfeto de hidrogênio. Os resultados da análise bucal foi negativa ou extremamente baixa para os CSV utilizando o sensível método titulador. No entanto, utilizando espectrômetro de massas foi evidenciado a presença de compostos como: sulfeto de hidrogênio, etanol, metilmercaptana, carbonil sulfeto, dióxido de enxofre e dissulfeto de carbono. Os autores mostraram claramente que somente os aminoácidos que contêm enxofre e materiais proteináceos são capazes de intensificar o odor produzido nos sistemas de putrefação.

TONZETICH et al. (1967) para provar que somente os compostos de enxofre intensificam o hálito incorporaram grandes concentrações de metilamina e cadaverina na saliva de 5 a 10 pacientes antes e depois da incubação e demonstraram claramente a inabilidade das aminas em intensificar o odor nas medidas organolépticas. Para medir as quantidades de indol e escatol produzidos pela saliva a partir do triptofano utilizaram métodos químicos e o odor foi avaliado organolepticamente. No entanto, não houve correlação entre a intensidade do odor e as concentrações de compostos indol e indonil produzidas. Verificou-se que os sistemas salivares enriquecidos com indol não obtiveram maior odor nas amostras incubadas. Os autores concluíram que para um composto ser odorífero, ele precisa ser volátil. A mera

presença de indol e aminas, que emanam um odor objetivo no estado puro, não significa que terão o mesmo comportamento na saliva ou cavidade oral. Nas condições ambientais da cavidade oral, eles não proporcionam odor à saliva devido a sua extremamente baixa volatilidade que não permite a detecção no ar expirado.

TONZETICH e KESTENBAUM (1969) complementaram os trabalhos de RICHTER e TONZETICH (1964), avaliando agora os produtos voláteis produzidos a partir da placa dental. Um pool salivar de 12 a 24 indivíduos, sendo 10 mL de cada um, foi coletado. Amostras de placa dental individuais e pool foram coletadas de 6 indivíduos e cultivadas na saliva, em caldo nutriente (com 0,3% de caldo de carne) e meio *trypticase-yeast extract basal medium* (TYE) a 37°C. Avaliações organolépticas e dos CSV através do espectrômetro de massas, modificado do trabalho de 1964 e no TitriLog foram realizadas. Os resultados mostraram presença de sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana, dimetildisulfeto e dióxido de enxofre e muito etanol. Verificou-se que os compostos foram similares nos 2 meios, mas que as proporções individuais foram diferentes. O composto dominante foi o dimetildisulfeto, seguido pela metilmercaptana, sulfeto de hidrogênio e óxido de enxofre. Esses achados são semelhantes aos de 1964, concluindo que o perfil cromatográfico é similar para saliva e placa dentária.

Em 1971, TONZETICH e CARPENTER estudaram a produção de CSV a partir dos aminoácidos L-cistina, L-cisteína e L-metionina. Inocularam pool de placa bacteriana em pool de filtrado salivar esterilizado de 3 indivíduos selecionados dentro de tubos de cultura selados e incubados a 37°C por até 24 horas. A análise da cromatografia gasosa foi realizada com a coleta de 1 mL do ar do headspace sobre os tubos com uma seringa de gás hermética e injeção diretamente dentro da coluna do cromatógrafo Micro Tek MT-220, que possui um programa de estado sólido, 750V, um detector de chama fotométrico (FPD) com filtro de 394 nm e um eletrômetro dual para simultaneamente monitorar a ionização de chama e os sinais fotométricos liberados. Os componentes sulfurados foram separados em uma coluna de vidro (20 ft x 1/8 in.) envolvida em Carbowax 20 M e seletivamente demonstrado por um sistema detector de chama fotométrico. Os resultados mostraram que nos sistemas enriquecidos com cistina e cisteína o padrão cromatográfico foi semelhante evidenciado pela

presença de 7 picos, onde metilmercaptana e sulfeto de hidrogênio (este predominante), contaram mais de 95% dos voláteis sulfurados. Os sistemas enriquecidos com metionina obtiveram no total 8 picos no cromatógrafo, sendo evidente a presença de metilmercaptana e dimetildisulfeto, pequenas quantidades de sulfeto de hidrogênio e um composto não identificado.

Neste mesmo ano, TONZETICH (1971) empregou esses procedimentos refinados de cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama na tentativa de desenvolver um método para detecção e quantificação de quantidades na unidade de subnanogramas de enxofre, agora no ar bucal. É considerado o primeiro trabalho com sucesso de detecção de CSV do ar bucal. 15 indivíduos (10-50 anos) não fumantes foram selecionados e doaram 10 mL de ar bucal (seringa introduzida na boca e o ar injetado no aparelho de cromatografia, que foi o mesmo descrito no trabalho anterior). Análises do headspace da saliva em putrefação foram conduzidos dos mesmos indivíduos. Todos os indivíduos mostraram quantidades mensuráveis de enxofre no ar bucal e foram identificados 3 CSV. Sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana, que corresponderam a 90% do conteúdo de enxofre da amostra, emanaram um odor pútrido. O terceiro componente (menos odorífero) foi identificado com base no tempo de retenção na coluna de teflon, como dimetilsulfeto. As amostras de saliva mostraram os mesmos três compostos do ar bucal. Desde que após os testes serem conduzidos, os indivíduos receberam procedimentos de higiene bucal e ao analisar amostras desse ar, houve redução dos CSV, o autor concluiu que os CSV determinados são produzidos por um processo de putrefação ocorrido na cavidade bucal.

SOLIS e VOLPE (1973) coletaram saliva humana e a incubaram por 24 horas a 37°C. Após esse período coletaram amostra de 5 mL dos voláteis sobre os frascos e injetaram-nos no aparelho de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama acoplado a um sistema titulador microcoulométrico específico para os voláteis de enxofre. Conseguiram detectar 4 CSV, sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana, dióxido de enxofre e dimetilsulfeto.

Em 1975, SOLIS-GAFFAR et al. conduziram um estudo clínico com 13 indivíduos portadores de halitose, mas com boa saúde bucal e testando um enxaguatório sobre a produção de CSV. O aparelho de cromatografia gasosa

foi o MT-220 com detector fotométrico de chama (Tracor, Inc, Austin, Tex.), com as seguintes modificações: adição de uma válvula de 8 portas com aprisionamento *trap* de 10 mL de ar, um integrador digital Autolab 6230 para medir simultaneamente os picos, e uma impressora. Uma das extremidades da válvula foi adaptada à boca do paciente e a outra extremidade adaptada ao aparelho. Os autores observaram que o detector de chama fotométrico (FPD) quando equipado com um filtro 394nm tem uma alta especificidade e sensibilidade para medir os CSV. A coluna analítica de teflon previne a perda de compostos da amostra devido à adsorção dessa coluna. Os resultados mostraram que ar matinal e ar após 3 horas do uso do enxaguatório foram similares, evidenciando a presença de sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e em menores quantidades o dimetilsulfeto. As análises mostraram também redução nos níveis detectados de sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana com o uso do enxaguatório.

BLANCHETTE e COOPER (1976) adaptaram a técnica de cromatografia gasosa para quantificar sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana a níveis de diminutas partes por bilhões (ppb) em amostras (10 mL) de ar bucal de 21 indivíduos. A média de valores de sulfeto de hidrogênio foi de 65 a 698 ppb e de 10 a 188 ppb de metilmercaptana. As modificações provaram ser eficientes nas determinações de baixas concentrações dos compostos odoríferos, como ocorre na cavidade bucal.

Uma técnica organoléptica (escore 0-4 de intensidade) e cromatografia gasosa equipada com um detector fotométrico de chama (FPD) específico para enxofre, utilizada no estudo de TONZETICH (1971), foram empregadas por SCHMIDT et al. (1978) para estudar a relação entre os valores organolépticos do mau odor bucal e as correspondentes concentrações dos CSV sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana em dois estudos separados. No estudo I 36 indivíduos foram selecionados e doaram 10 mL de ar bucal para a cromatografia. A seguir 3 juízes de odor conduziram a avaliação organoléptica. O estudo II foi conduzido 10 meses após a conclusão do primeiro com duas modificações, neste estudo 66 indivíduos participaram com uma amostra de 7 ml de ar bucal. Os estudos demonstraram uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o mau odor oral avaliado organolepticamente e as concentrações de CSV emitidas pelos indivíduos.



SCHMIDT e TARBET, em 1978, testaram o enxaguatório LAVORIS, uma solução salina e nenhum tratamento sobre o nível do mau hálito medido por avaliações organolépticas e correspondentes concentrações dos CSV (mesma metodologia do trabalho anterior) em 62 indivíduos. O enxaguatório foi significativamente superior às demais terapias na redução dos escores organolépticos e CSV por 3 horas, que foi a duração do tratamento.

Em 1979, SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, estudaram o papel de microrganismos bucais na formação dos componentes odoríferos associados com mau odor bucal. Espécies foram incubadas individualmente, em condições anaeróbicas a 37°C em um sistema de saliva esterilizado com adição de cisteína como substrato. Análises de cromatografia gasosa (mesmo aparelho e metodologia utilizados no trabalho de 1975) foram conduzidas. Os resultados mostraram, que os organismos Gram-negativos produziram CSV, sendo metilmercaptana e sulfeto de hidrogênio com os principais picos e dimetilsulfeto com o pico menor. Os autores concluíram que os resultados comparados aos trabalhos anteriores comprovam ser os microrganismos orais importantes na produção de odor, este mau odor pode ser sentido organolepticamente e pode ser visualizado pela cromatografia gasosa a partir dos CSV; os cromatogramas do headspace da saliva esterilizada incubada com Gram-negativos são similares aos daqueles obtidos das amostras de ar bucal, assim como do headspace da saliva em putrefação.

Em 1980, SOLIS-GAFFAR, RUSTOGI e GAFFAR estudaram a relação entre saúde gengival e fluxo de fluido gengival, através da produção de sulfeto de hidrogênio a partir desse fluido. Amostras de fluido gengival obtidas com pontas de papel foram incubadas com L-cisteína em 2 mL de saliva filtrada esterilizada, durante 72 horas a 37°C em um frasco de vidro. O sulfeto de hidrogênio presente no headspace do sistema incubado foi determinado quantitativamente usando um cromatógrafo gasoso e um sistema de detecção de chama fotométrico (FPD), descrito no trabalho de 1975. Os resultados evidenciaram uma forte correlação entre o volume do fluido gengival e a produção de sulfeto de hidrogênio por este fluido, relacionando este composto com inflamação gengival.

Em 1980, KOSTELC et al. estudaram 7 indivíduos saudáveis periodontalmente e 7 indivíduos com periodontite moderada à severa. Obtiveram saliva estimulada com goma de acetato de polivinil, durante 10 minutos de cada indivíduo e os voláteis do headspace salivar foram injetados num tubo equipado com Tenax e então avaliados pelo sistema cromatografia gasosa Perkin-Elmer 990 e espectrometria de massa Hitachi/Perkin Elmer RMU-6L com um separador Watson & Biemann 1965. Os resultados mostraram dimetildisulfeto e dimetiltrisulfeto no headspace salivar dos dois grupos de pacientes.

Análises do headspace de cultivos microbiológicos foram realizadas para demonstrar a produção de CSV, utilizando o sistema de cromatografia gasosa. Duas espécies de *B. melaninogenicus* orais foram comparadas quanto à produção de CSV no aparelho MT 550 Tracor (Micro Tek Instruments Corp., Austin, Tex., USA). A espécie patogênica produziu quantidades significativas de CSV, predominantemente metilmercaptana e dimetildisulfeto. A espécie não patogênica produziu quantidades diminutas de CSV, sendo predominante o sulfeto de hidrogênio (TONZETICH e McBRIDE, 1981). MINK et al. (1983) evidenciaram que membros do gênero *Fusobacterium* e microorganismos espiroquetas produzem níveis maiores de sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana do que outros gêneros não *Treponema* analisados. PERSSON, CLAEISSON e CARLSSON (1989) injetaram os voláteis formados por amostras de microbiota subgingival no cromatógrafo com FPD, modelo 8400; Perkin-Elmer e observaram que o principal gás formado foi sulfeto de hidrogênio, mas quantidades significativas de metilmercaptana também foram formadas. Pequenas quantidades de dimetilsulfeto e dimetildisulfeto foram detectadas.

Vários trabalhos utilizam o Halimeter® para as medidas dos CSV, juntamente com avaliações organolépticas *in vivo* e *in vitro* (De BOEVER e LOESCHE, 1995; GREENSTEIN et al., 1997; WILLS et al., 1999; QUIRYNEN et al., 1999; MORITA e WANG, 2001; QUIRYNEN et al., 2003).

COVENTRY et al. (2000) em revista de literatura enfatizam a importância de 4 CSV: sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana, dimetilsulfeto e dimetildisulfeto.

LEE, MAK e NEWSOME (2004) fizeram uma revisão da literatura sobre etiologia e tratamento da halitose bucal e escreveram que metilmercaptana parece ser o componente mais malcheiroso dos compostos voláteis e tem alta correlação com escores organolépticos.

Em 2005, WASHIO et al. estudaram 10 indivíduos com queixa de halitose através de cromatografia gasosa, Breathtron e escores organolépticos de intensidade (escala 0-4). Dos estudos microbiológicos algumas bactérias foram relacionadas como produtoras de sulfeto de hidrogênio através da cromatografia gasosa.

Em 2006, KRESPI, SHRIME e KACKER em artigo de revisão sobre halitose montaram uma tabela com os CSV já citados até então incluindo sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana, metantio, alilmercaptana, dimetilsulfeto, dimetildisulfeto e dimetiltrisulfeto.

VELDE et al. (2007) estudaram 14 voláteis associados com halitose, no ar alveolar e bucal, utilizando um sistema de CG/EM. Dos compostos estudados 7 foram CSV: dimetilsulfeto, dimetildisulfeto, dimetiltrisulfeto, aliltrimetilsulfeto, disulfeto de carbono, sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana. Dimetildisulfeto e dimetiltrisulfeto foram encontrados também no ar da sala do laboratório, sugerindo que esses compostos podem ser de origem ambiental. Os demais compostos foram produtos endógenos ou produzidos pela ação bacteriana na cavidade bucal. Os autores enfatizam a habilidade do sistema CG/EM para análises de compostos e para a diferenciação da sua origem, se oral ou interna.

#### 2.5.4 Compostos Orgânicos Voláteis (COV)

Os Compostos Orgânicos Voláteis ou COV, como são mais conhecidos, são os produtos da putrefação bacteriana sobre substrato que não contem enxofre. Enquanto vários (ou a maioria) dos estudos prévios mostre correlações entre os CSV e níveis do mau hálito é provável que outros compostos encontrados na cavidade bucal possam contribuir para esse mau odor.

Segundo PERSK e BILLY (1962) compostos como indol, escatol e aminas tem sido relacionados como importantes produtos malcheirosos em culturas bacterianas anaeróbicas.

KOSTELC et al., em 1980 avaliaram a produção de compostos a partir dos voláteis do headspace salivar de pacientes periodontais e pacientes saudáveis, por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Os resultados mostraram que vários compostos como álcoois aromáticos e alifáticos, fenol, cresol, indol, escatol, difenilamina, alcanos com 8 a 12 carbonos e 17 carbonos, acetona, benzeno, tolueno, estireno foram encontrados nos dois grupos de pacientes. Piridina e uma ou mais metilpiridinas estavam presentes somente nos pacientes com doença periodontal moderada e avançada indicando que podem estar relacionados ao processo de doença.

Em 1994, GOLDBERG et al., avaliaram a possibilidade de que cadaverina e putrescina, duas diaminas odorígenicas associadas com putrefação bacteriana, estivessem associadas com mau hálito. Participaram do estudo 52 pacientes entre 11 e 63 anos de idade. Registros do índice de placa (PI), índice gengival (GI), profundidade de bolsa, teste BANA (com amostras de bolsas rasas, língua e saliva) foram realizados. Medida dos níveis de CSV foi realizada através do Halimeter. Avaliações organolépticas (da boca toda, da língua e saliva) foram realizadas por um juiz. Análises das aminas foram conduzidas injetando as amostras de saliva na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As amostras de saliva foram inicialmente ativadas usando o reagente O-ftaldialdeído e então injetadas no sistema de HPLC. Os resultados evidenciaram um importante papel da cadaverina como componente do mau odor oral, tendo altas correlações os níveis dela com medidas organolépticas, mas não houve correlação entre cadaverina e CSV. Já os níveis de putrescina não foram associados nem com escores organolépticos nem com níveis de CSV. Desta forma parece que os níveis de cadaverina estão associados com mau odor oral e que esta associação pode ser independente dos CSV.

O trabalho conduzido por De BOEVER e LOESCHE (1995) foi conclusivo sobre o papel dos CSV, bactérias BANA positivas na língua, saburra lingual e fissuras serem todos associados com mau odor oral e parecem ser fatores importantes no processo de halitose. Observa-se que os escores BANA

foram associados com taxas organolépticas da língua e do ar bucal, mas não com as medidas de CSV. Esses achados estão de acordo com relatos de KOZLOVSKY et al. (1994) que sugeriram que as bactérias BANA positivas podem ser responsáveis por ácidos graxos voláteis no hálito, além dos CSV. Embora os CSV sejam considerados os principais constituintes do mau hálito, o ar expirado pode conter esses ácidos graxos voláteis e cadaverina, que comprometem o hálito (e podem ser percebidos organolepticamente) mas não são identificados pelo halimeter.

PHILLIPS et al. (1999) estudaram a variação na composição dos COV do hálito de 50 indivíduos normais, usando CG/EM. Detectaram 3481 diferentes COV, mas com ampla variação entre os indivíduos, sendo que 27 deles foram observados em todos os 50 indivíduos. Compostos como 2-metil butano, ácido acético, pentano entre outros foram observados. Os autores enfatizam que a presença de pentano no hálito é um marcador de atividade aumentada de estresse oxidativo em várias condições como rejeição de transplante cardíaco, infarto agudo do miocárdio, esquizofrenia e artrite reumatóide.

Para testar se diaminas também são produzidas *in vitro*, GOLDBERG, KOZLOVSKY e ROSENBERG (2003) conduziram experimentos com saliva inoculada em meio descarboxilase, com adição opcional de aminoácidos. As amostras de saliva foram coletadas de um indivíduo sem doença periodontal e de um indivíduo com doença periodontal moderada. Os tubos foram incubados na posição vertical a 37°C e checados diariamente quanto a mudança na coloração de amarelo para púrpura, que indica a mudança de ácido para base. Amostras (0,2mL) foram retiradas em vários tempos e analisadas pela HPLC. O nível dos sulfetos voláteis foi determinado no espaço aéreo dos tubos através do Halimeter®. Os resultados mostraram que na ausência de aminoácidos exógenos, a concentração de cadaverina foi após 72 horas de incubação, o dobro na amostra do indivíduo com doença periodontal comparada com a concentração obtida do indivíduo saudável. Os níveis de putrescina foram geralmente maiores que os da cadaverina, mas não estavam elevados no indivíduo com doença periodontal. Os níveis de CSV e escores organolépticos apresentaram-se reduzidos em valores de pH abaixo de 5.

Num segundo experimento (GOLDBERG, KOZLOVSKY e ROSENBERG, 2003) a produção de diaminas foi avaliada em bolsas profundas e rasas de 24 pacientes com doença periodontal. Cones de papel esterilizados foram inseridos nas bolsas profundas ( $\geq 4\text{mm}$ ) e como controle nas bolsas rasas ( $< 4\text{mm}$ ) e então inoculados em um tubo contendo 5 mL de meio descarboxilase. Os resultados mostraram que níveis médios de cadaverina e putrescina, escores organolépticos e valores médios de pH foram significativamente maiores nos tubos de teste inoculados com cones de papel de bolsas profundas em comparação com as bolsas rasas. Os resultados dos dois últimos experimentos, se analisados em conjunto, sugerem que os níveis de diaminas (cadaverina em particular) na saliva, assim como no meio inoculado com amostras obtidas de bolsas periodontais, estão associados com a produção de mau hálito oral. Os resultados per se não mostram que uma delas ou ambas são componentes reais do mau hálito oral. Entretanto, estes compostos são moléculas malcheirosas que são produzidas como resultado de proteólise bacteriana e que podem ser volatilizadas a partir da desidratação da pele humana. O nível de cadaverina estava associado com a produção de mau hálito e saúde periodontal. O papel da putrescina, se é que existe algum, permanece complexo. Os autores sugerem estudos adicionais para demonstrar a presença de cadaverina e/ou putrescina no ar bucal e identificar a microbiota oral que produz estes compostos na saúde e na doença.

LOESCHE e DE BOEVER (2003) revisando a literatura afirmaram que os microrganismos pertencentes aos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* assim como *Treponema*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Peptococcus* e *Eubacterium*, produzem grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia curta, tais como propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato, que são os produtos finais de sua atividade metabólica sobre proteínas e peptídeos. Estes ácidos graxos são os principais responsáveis pelo odor fétido das culturas desses microrganismos quando cultivados em laboratório.

GREENSTEIN et al. (1997) estudando as propriedades anti-mau odor de pastilhas oxidativas, balas e chicletes avaliou 123 voluntários e registrou alguns parâmetros de interesse, como: análises de diaminas (cadaverina e putrescina) na saliva total não estimulada usando HPLC, medida de CSV pelo halímetro e escores organolépticos.

PATOCKA e KUEHN (2000) reforçaram a teoria da presença de outros componentes da halitose além dos CSV sendo, as aminas ou poliaminas, que são resultado da hidrólise dos peptídeos a aminoácidos (lisina, arginina e ornitina), que são então metabolizados liberando estas aminas de baixo peso molecular.

Em 2005, IWANICKA-GRZEGOREK et al. fizeram um estudo para avaliar a relação entre a concentração de compostos que contém enxofre voláteis, medidas organolépticas e aminas de baixo peso molecular. Como essas aminas não são medidas usualmente pelo Halimeter os autores, então, utilizaram para medida do nível total de aminas na saliva a reação colorimétrica ninhydrin (pode ser usada para exames de aminoácidos e aminas de baixo peso molecular). A detecção de aminas de baixo peso molecular poderá fornecer informação adicional sobre o nível de substrato usado durante a putrefação bacteriana. Teoricamente, o nível do substrato que sofre putrefação bacteriana deveria ser importante como um fator etiológico da halitose. Os CSV foram medidos através do Halimeter. Foram selecionados para o estudo 84 pacientes portadores de halitose e 40 voluntários não portadores de halitose, com idade entre 20 e 62 anos. As análises mostraram que o nível de aminas foi maior nos indivíduos com halitose e correlacionada significativamente com medidas de CSV e escores organolépticos. O nível de aminas no grupo controle foi menor e permaneceu estável com o tempo. Os autores concluíram que o nível de aminas salivares teve altas correlações com níveis dos CSV e escores organolépticos, indicando assim, que este método pode ser uma alternativa ou método adicional de diagnóstico da halitose, podendo ser utilizado também para avaliar a eficácia do tratamento.

PHILLIPS et al. (2005) desenvolveram um estudo piloto com 7 pacientes portadores de mau hálito sobre um novo método de avaliação desta condição, utilizando cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (CG/EM) para identificar os COV. Dois juízes avaliaram o odor organolepticamente com escala 0-5. Para as medidas dos COV foi coletado de todos os pacientes uma amostra do ar bucal inflando uma bolsa coletora de hálito multi laminada de 200 mL (Quintron, Inc., Milwaukee, WI, USA). Amostras de ar (150 mL) foram extraídas das bolsas e injetadas em *traps* para assim capturar os COV. Os COV foram identificados por uma biblioteca virtual e quantificados pela sua

proporção em relação a um padrão interno. Determinação de contaminantes nas bolsas foi feita de maneira similar, inflando-as com hélio e subtraídos a partir dos COV no hálito. Os resultados evidenciaram que em torno de 80% das amostras era de alcanos e alcanos metilados. Esses COV são produtos do stress oxidativo gerado pela peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares. Esses achados sugerem que o mau odor oral pode ser considerado mais sério do que um constrangimento social – ele pode também ser um sinal de aumento de stress oxidativo na cavidade bucal e aumentar o risco de doenças vasculares. Este teste poderia ser utilizado como um novo método para medida do mau hálito e um grande estudo clínico está em andamento para testar essa hipótese.

Em 2006, KRESPI, SHRIME e KACKER em artigo de revisão sobre halitose montaram uma tabela com os COV já citados até então incluindo ácidos propiônico, butírico, valérico, isocapróico, cáprico, 2 e 3 ácido etil butírico, ácido láurico, ácido mirístico, as poliaminas cadaverina e putrescina, o álcool 1 peopoxi 2 propanol, indol, escatol, piridina, 2 metil propano, cetonas e compostos nitrogenados como uréia e amônia.

VELDE et al. (2007) estudaram 14 voláteis associados com halitose, no ar alveolar e bucal, utilizando um sistema de CG/EM. Dos compostos estudados 7 foram COV: acetona, 2 butanona, 2 pentanona, indol, escatol, dimetilselenide, 1 propanol. 2 butanona foi encontrada também no ar da sala do laboratório, sugerindo que esse composto pode ser de origem ambiental. Os demais compostos foram todos produtos endógenos ou produzidos pela ação bacteriana na cavidade bucal. Os autores enfatizam a habilidade do sistema CG/EM para análises de compostos e para a diferenciação da sua origem, se oral ou interna.

## 2.6 IMPORTÂNCIA DOS AMINOÁCIDOS NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS

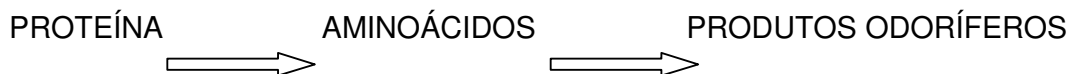
Em 1930 PRINZ escreveu sobre as causas e prevenção da halitose, que ele chamou de hálito ofensivo. Para esse autor 90% das causas do problema tem origem na estagnação de debris sobre os dentes, que sofrem fermentação bacteriana. Desses restos alimentares os carboidratos dão origem



a vários compostos como ácido butírico e propiônico. As proteínas são degradadas e originam compostos como sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana. O substrato preferencial dos microrganismos na geração da halitose é protéico e pode ser do tipo exógeno ou endógeno, constituído de epitélio oral esfoliado, corpúsculos salivares, depósitos de alimentos, saliva e sangue (MASSLER, 1951).

Embora a natureza química exata dos estágios iniciais da degradação protéica não ser completamente conhecida, muitos autores acreditam ser um processo de hidrólise (LAW, BERG, FOSDICK, 1943). Assim, após o estágio inicial de hidrólise a proteoses, peptonas e aminoácidos, vários tipos de reações químicas ocorrem, separadamente ou simultaneamente. As proteoses e petonas podem ser degradadas a aminoácidos ou podem, juntamente com os aminoácidos ser oxidados, reduzidos, deaminados ou descarboxilados. Em qualquer desses eventos, existe uma marcante produção de compostos odoríferos.

Assim parece óbvio que o mecanismo de formação da halitose é:



BERG, BURRIL, FOSDICK (1946) estudaram a taxa de putrefação das proteínas salivares. Verificaram que a geração de odores foi particularmente significativa quando a saliva foi incubada anaerobicamente e na presença de caseína como substrato adicional. A caseína foi adicionada devido aos resultados anteriores indicarem que a quantidade de proteína salivar poderia ser um fator limitante para a taxa de putrefação.

Aminoácidos como L-lisina sofrem descarboxilação gerando a diamina cadaverina, que é mal cheirosa. Vários caminhos metabólicos transformam o aminoácido L-arginina em amina putrescina, como a sua descarboxilação (GALE, 1946) ou deaminação ou a conversão direta da L-arginina em L-ornitina seguida pela descarboxilação da L-ornitina em putrescina (HAYES e HIATT, 1974).

Em 1953, FOSDICK e PIEZ estudaram os aminoácidos com o método do papel cromatográfico e ninhydrin. A saliva foi obtida de pacientes periodontais e de pacientes sem doença periodontal (estudantes de Odontologia) por estímulo com parafina. Os principais aminoácidos encontrados foram lisina, glicina, alanina, ácido glutâmico e uma substância incomum que pode ser o ácido  $\delta$  – aminovalérico, não havendo grandes diferenças entre o grupo periodontal e não periodontal. Na saliva dos pacientes periodontais encontraram também grandes quantidades de amins voláteis não identificadas.

Os trabalhos de TONZETICH e colaboradores nas décadas de 60 e 70 foram importantes na determinação do valor dos aminoácidos gerando mau odor. TONZETICH e RICHTER (1964) adicionaram alguns substratos nos sistemas salivares incubados e avaliaram o odor gerado organolepticamente. A saliva enriquecida com L-arginina, L-cisteína e L-triptofano tiveram medidas organolepticas respectivamente de 2.3, 4.0 e 2.2, ficando claro o papel dos aminoácidos ricos em enxofre em intensificar o odor. L-metionina e L-cistina estimularam a produção de odor com o passar do tempo. As observações descritas foram contrárias ao conceito tradicional da época de que as amins e amônia eram os principais responsáveis pelo mau odor. Em 1971, TONZETICH e CARPENTER inocularam placa bacteriana em filtrado salivar esterilizado enriquecido com os aminoácidos L-cistina, L-cisteína e L-metionina e avaliações cromatográficas dos compostos gerados foram conduzidos. Nos sistemas cistina e cisteína o padrão cromatográfico foi semelhante com mais de 95% dos voláteis representados por sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana. Os sistemas com metionina obtiveram no total 8 picos no cromatógrafo, sendo evidente a presença de metilmercaptana e dimetildisulfeto e pequenas quantidades de sulfeto de hidrogênio.

O aminoácido L-cisteína foi utilizado para enriquecer os sistemas salivares em trabalho com microrganismos por SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR (1979). Os autores confirmaram que este substrato é precursor da metilmercaptana, sulfeto de hidrogênio e dimetilsulfeto. Um ano depois SOLIS-GAFFAR, RUSTOGI e GAFFAR (1980) utilizaram este aminoácido para enriquecer amostras de fluido gengival e verificar o potencial de produção de sulfeto de hidrogênio. Conseguiram identificar o composto em altas

quantidades neste sistema, confirmando mais uma vez o papel deste aminoácido na geração do mau odor.

Em 1986, PIANOTTI, LACHETTE e DILLS incubaram amostras bacterianas ATCC de *F. nucleatum* enriquecidas com L-metionina e L-cisteína. Os produtos formados foram avaliados por métodos colorimétricos, espectrometria cintilante e outros métodos analíticos descritos. Os autores mostraram que a degradação de L-cisteína leva a formação do sulfeto de hidrogênio. Enquanto que a degradação da L-metionina leva à formação da metilmercaptana.

CLAESSON et al. (1990) enriqueceram a solução salina testada com os aminoácidos L-cisteína e L-metionina para visualizar na cromatografia gasosa a produção de CSV a partir de 12 espécies do gênero *Fusobacterium*. Os autores verificaram que L-cisteína foi precursora de sulfeto de hidrogênio pela ação das 12 espécies. Sete espécies formaram metilmercaptana a partir de L-metionina.

CARLSSON, LARSEN e EDLUND (1993) testaram 37 espécies de bactérias Gram-negativas bucais (ágar sangue e sob condições anaeróbicas) com relação à utilização de peptídeos e aminoácidos na formação de sulfeto de hidrogênio (analisados por cromatografia gasosa). Os autores provaram que alguns dos gêneros *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* utilizaram o tripeptídeo glutatione e o dipeptídeo L-cisteinilglicina para formar o sulfeto de hidrogênio. Isso aumenta o recurso alimentar bacteriano na formação de compostos odoríferos, pois até esse momento acreditava-se que esses peptídeos teriam que ser degradados ao aminoácido L-cisteína para poder ser utilizado.

PATOCKA e KUEHN (2000) confirmaram que os aminoácidos L-lisina, L-arginina e L-ornitina são metabolizados liberando aminas ou diaminas de baixo peso molecular, de potencial odorífero.

YOSHIMURA et al. (2000) mediram a formação de metilmercaptana a partir da degradação de L-metionina nas espécies *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *Escherichia coli*. *P. gingivalis* e *F. nucleatum* produziram metilmercaptana, enquanto *A. actinomycetemcomitans* e *Escherichia coli* não o fizeram.

Em 2002, GREENMAN, SPENCER e MCKENZIE incubaram 3 espécies bacterianas com suplemento de L-cisteína para verificar se esse aminoácido induz produção de cisteína desulfidrilase, que é a atividade mais responsável pela produção de sulfeto de hidrogênio. As medidas deste gás foram realizadas com detector de sulfeto (Halimeter®). Os autores concluíram que a atividade cisteína desulfidrase é influenciada nos biofilmes em crescimento com cisteína.

GOLDBERG, KOZLOVSKY e ROSENBERG (2003) adicionaram L-lisina ao meio descarboxilase testado e os níveis de cadaverina aumentaram dramaticamente. A adição de L-ornitina, L-arginina e L-histidina ocasionou mudanças muito menores nos níveis daquele composto. Já a adição tanto de L-ornitina quanto L-arginina aumentou os níveis da putrescina e a adição da L-lisina diminuiu a produção.

KLEINBERG e CODIPILLY (2003) trabalharam com misturas de incubação contendo várias culturas puras de bactérias orais e aminoácidos e os odores foram verificados organolepticamente. Os Gram-negativos produziram odor principalmente, a partir de 6 aminoácidos: L-cistina, L-cisteína, L-metionina, L-triptofano, L-ornitina e L-arginina. Contribuições menores a partir da L-histidina ocorreram. Dessa forma os autores creditaram aos aminoácidos sulfurados mais triptofano e ornitina o principal papel como substratos envolvidos na geração do mau hálito, porém não exclusivamente.

LEE, MAK e NEWSOME (2004) em revisão da literatura a respeito do substrato para mau odor afirmaram que a maioria das proteínas encontradas na cavidade bucal encontra-se na forma de glicoproteínas e as bactérias que alimentam-se de açúcar podem quebrar resíduos a partir dessas glicoproteínas, levando peptídeos livres a serem digeridos por outras bactérias. Essas outras bactérias realizam a proteólise de aminoácidos ricos em enxofre como L-cistina e L-metionina a partir das proteínas da saliva, epitélio descamado, restos de alimentos, fluido crevicular gengival, placa interdental e gotejamento nasal posterior, gerando os compostos odoríferos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de Março à Novembro de 2006 desenvolvemos a metodologia de cultivo microbiológico anaeróbio juntamente com a técnica cromatográfica deste estudo. Após esse período conseguimos a padronização desta metodologia e a parte experimental foi então realizada de Dezembro de 2006 a Julho de 2007.

#### 3.1 SELEÇÃO DO PACIENTE FONTE

A paciente I. S. P. F., sexo feminino, 51 anos, profissão serviços gerais procurou a atenção da odontologia com a queixa principal de “problemas na gengiva”. A mesma foi esclarecida sobre os objetivos deste estudo, concordou em participar e assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e recebeu o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 0130.0.094.000-07 (ANEXO 2). Anamnese foi realizada com a finalidade de identificar problemas de saúde de ordem sistêmica e hábitos de higiene bucal. A paciente relatou não possuir halitose, doença sistêmica, não ter feito uso de antibióticos nos três meses que antecederam a coleta microbiológica, não fazer uso de anti-séptico bucal e não realizar a higiene da língua rotineiramente. Foi realizado o exame clínico periodontal, incluindo anotações de dentes ausentes, profundidade clínica de sondagem, que corresponde à distância da margem gengival ao limite mais apical da bolsa periodontal, realizado com sonda periodontal Williams convencional Hu-Friedy PQW em seis pontos de cada elemento dental (mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual, médio-palatino/lingual, disto palatino/lingual), sangramento à sondagem, lesões de furca com sonda de Nabers e mobilidade dental. A avaliação da mobilidade dental é realizada por meio de instrumentos adequados como os 2 espelhos clínicos que utilizamos, após a aplicação de uma força moderada no sentido vestibulo-lingual ou palatina. Dessa forma a amplitude do movimento da coroa dos dentes pode ser classificada em Grau 1: mobilidade dental no sentido horizontal < 1mm; Grau 2: mobilidade dental no sentido horizontal > 1mm; Grau 3: mobilidade dental no sentido vertical. O diagnóstico de Periodontite Crônica Severa para a doença

periodontal apresentada pela paciente foi baseado nos dados do exame clínico periodontal, onde profundidade de sondagem superior a 6 mm caracteriza a condição (Consensus Report, 1999; Parameters on Chronic Perio, 2000a,b) seguindo a classificação das doenças e condições periodontais da AAP-1999 (ARMITAGE, 1999). O grau de halitose da paciente foi avaliado clinicamente através do monitor de sulfetos Halimeter® (Insterscan) e obteve valor 120 ppb nesta medida e complementado pelo método organoléptico Vieira & Falcão obtendo escore 2, que representa halitose da intimidade (ANEXO 3).

### 3.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SABURRA LINGUAL

Apesar de não fazer parte dos objetivos do estudo a determinação deste índice serviu para melhor caracterização da fonte da nossa amostra, no caso a paciente periodontal. Dessa forma, previamente à coleta da amostra, nós calculamos o escore da saburra lingual da paciente multiplicando o escore de espessura pelo escore da área (OHO et al., 2001; TANAKA et al., 2004). A área foi registrada visualmente com escores de 0 a 3 (0=sem saburra; 1=saburra cobrindo menos do que  $\frac{1}{3}$  do dorso lingual; 2=saburra cobrindo de  $\frac{1}{3}$  a  $\frac{2}{3}$  do dorso lingual; 3=saburra cobrindo mais do que  $\frac{2}{3}$  do dorso lingual). A espessura foi registrada visualmente com escores de 0 a 3 (0=sem saburra; 1=fina saburra com papilas linguais visíveis; 2=saburra moderada com metade das papilas linguais invisíveis; 3=saburra espessa com papilas linguais totalmente invisíveis).

### 3.3 COLETA DA AMOSTRA CLÍNICA E CULTURA MICROBIANA

A parte microbiológica foi realizada no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia, do Curso de Odontologia, do Centro Universitário Positivo (UnicenP), Curitiba-PR. Os cuidados com a assepsia foram observados em todas as fases da pesquisa. A amostra da microbiota lingual foi obtida raspando o dorso lingual com um depressor de língua de madeira esterilizado. Foi raspada a saburra lingual da papila valada à borda anterior da língua, em um único movimento (KAZOR et al., 2003). A saburra obtida foi depositada sobre papel alumínio esterilizado (5 x 5 cm) de peso conhecido e levada à balança de precisão (QUIMIS®). A amostra pesando 23,3 mg de saburra

lingual foi diluída em 50 mL de Caldo BHI (BIOBRÁS) agitada por 30 segundos em vortex (QUIMIS®) e alíquotas de 1 mL dessa suspensão (solução mãe) foram transferidas para cada um dos 27 *vials* ou frascos de vidro, de 40 mL de capacidade, com tampa vasada rosqueável de polipropileno com a abertura vedada por septo de silicone faceado com TEFLON (UnitechUSA Brand) já contendo 8,7 mL de caldo BHI. Cada grupo de 3 frascos (triplicata) foi enriquecido com 300 µL a 33 mM (PERSSON, CLAESSION e CARLSSON, 1989) de um dos substratos listados a seguir: L-cistina, L-cisteína, L-metionina, L-ornitina, L-arginina, L-lisina, L-triptofano, L-histidina e extrato de carne (todos da VETEC QUÍMICA FINA LTDA). Três frascos (triplicata) não receberam substratos servindo como controle. Todos os frascos receberam um fluxo de CO<sub>2</sub> por meio de uma agulha (27G-Longa, BECTON DICKINSON Ind Cirúrgica Ltda) atravessando o septo de silicone concomitantemente ao fechamento do aparato. Após o selamento, os frascos foram incubados em estufa bacteriológica (FANEN®) a 35°C por 14 dias.

### 3.3.1 Unidades Formadoras de Colônias

As unidades formadoras de colônia (UFC) foram determinadas a partir de alíquota de 500 µL da solução mãe, que foi diluída serialmente para 10<sup>-6</sup> parte em solução fisiológica estéril, na proporção de 500 µL da suspensão bacteriana em 4500 µL da solução fisiológica. Em seguida 100 µL de cada diluição foi plaqueado sobre ágar BHI e o espalhamento realizado com alça Drigalsky. As placas foram incubadas em jarras hermeticamente fechadas com gerador de anaerobiose (ANAEROGEN) a 35°C por 48 horas. Após este período as UFC foram contadas e multiplicadas pelo fator de diluição empregado, assim determinando a concentração de UFC/mg da saburra lingual.

### 3.3.2 Identificação Bacteriana

Para a identificação da composição bacteriana da amostra foi utilizada a técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (SOCRANSKY et al. 1994) sendo realizada no Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão da Universidade de Guarulhos-SP (UNG). Este método utiliza

sondas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas (TABELA 1).

TABELA 1 - RELAÇÃO DAS CEPAS EMPREGADAS PARA A CONFECÇÃO DAS SONDAS DE DNA

ESPÉCIES	CEPAS	ESPÉCIES	CEPAS
<i>A actinomycetencomytans a</i>	43718*	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201*
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104*	<i>Neisseria mucosa</i>	19696*
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146*	<i>Micromonas micros</i>	33270*
<i>Actinomyces israelii</i>	12102*	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277*
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	17929*	<i>Prevotella intermedia</i>	25611*
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860*	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845*
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236*	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563*
<i>Campylobater rectus</i>	33238*	<i>Propionibacterium acnes I</i>	11827*
<i>Campylobacter showae</i>	33612*	<i>Selenomonas noxia</i>	43541*
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624*	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397*
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596*	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612*	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558*
<i>Eikenella corrodens</i>	51146*	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335*
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099*	<i>Streptococcus mitis</i>	49456*
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271*	<i>Streptococcus oralis</i>	35037*
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	25586*	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556*
<i>F.n. (sp. polymorphum)</i>	10953*	<i>Veillonella parvula</i>	10790*
<i>F.n. (sp. vincentii)</i>	49256*	<i>Tannerella forsythia</i>	43037*
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693*	<i>Treponema denticola</i>	B1¶
<i>Gemella morbillorum</i>	27824*	<i>Treponema Socranskii</i>	S1¶

\*ATCC (American Type Culture Collection), Rockville, MD

¶Forsyth Institute, Boston, MA.

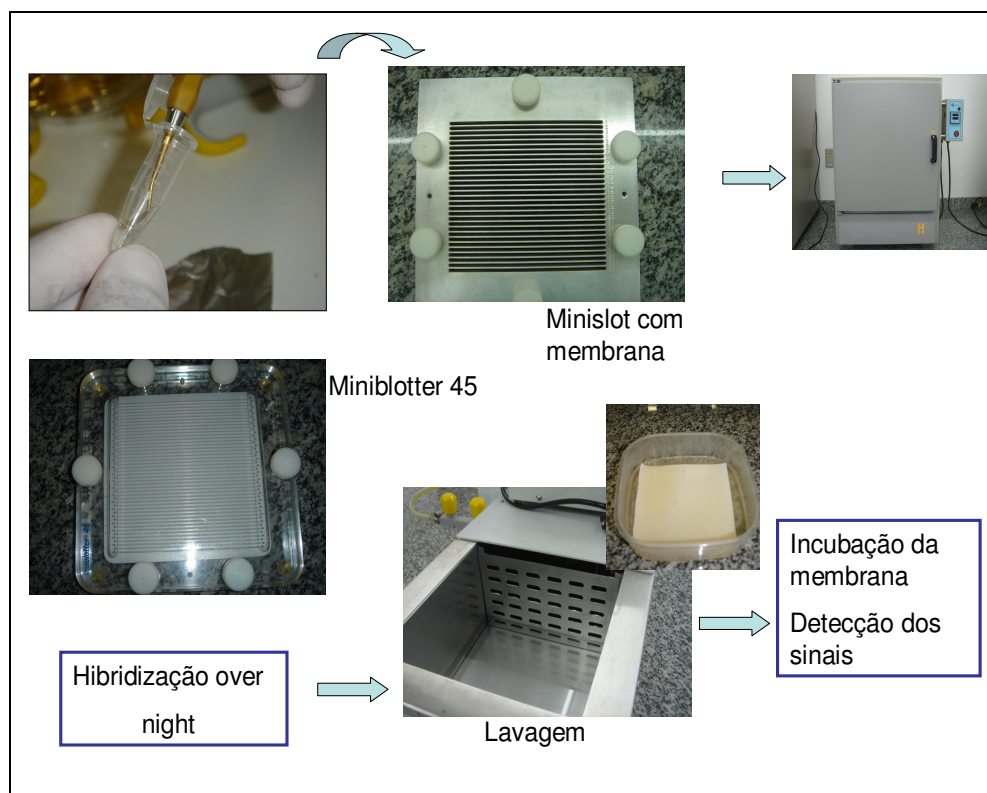
FONTE: FERES, M.; FIGUEIREDO, L.; GONÇALVES, C. Diagnóstico periodontal por sondas de DNA. **Periodontia: A atuação clínica baseada em evidências científicas.** PAIVA, J. S.; ALMEIDA, R. V. (coordenadores). São Paulo, Artes Médicas, 2005. p. 85-106.

Parte da amostra clínica foi colocada em um tubo plástico eppendorf contendo 150 µL de solução TE (10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) e imediatamente foram adicionados 100 µL de NaOH a 0,5 M para que o DNA permanecesse viável. A suspensão foi então fervida (desnaturação das fitas de DNA) e depositada em uma das canaletas paralelas do aparato denominado Minislot 30 (Immunelect, Cambridge, MA, USA), ficando assim concentrada em uma membrana de nylon com carga positiva. As duas últimas canaletas foram ocupadas por controles contendo



uma mistura das espécies avaliadas com contagem absoluta de  $10^5$  e  $10^6$ . Após a fixação do DNA a membrana foi transferida para o Miniblotter 45 (Immuntics), com as linhas de DNA posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Sondas de DNA marcadas com digoxigenina foram adicionadas às canaletas do Miniblotter 45 e hibridizadas à  $42^\circ\text{C}$  durante um período de 20 horas. Após várias lavagens realizadas com o objetivo de remover as sondas que não hibridizaram completamente, a membrana foi incubada em uma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina por 30 minutos. A detecção final foi realizada pela incubação da membrana na solução detectora CDP-Star (Amersham Biosciences UK Limited, England, UK) e exposta a um filme radiográfico por aproximadamente 40 minutos. O filme foi revelado e cada sinal produzido pela hibridização das sondas foi lido e armazenado (FIGURA 4).

FIGURA 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO MÉTODO *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION*



FONTE: a autora (2007)

### 3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA/ ESPECTROMETRIA DE MASSAS

#### 3.4.1 Instrumentos

As medições espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Por tratar-se de uma técnica complexa, que demanda aos técnicos, anos de estudo e prática diária aplicada nos aparelhos, não é nossa intenção realizar um tratado sobre a Cromatografia, mas algumas informações gerais, termos e definições serão introduzidos nesse momento para facilitar a compreensão do processo ao longo do texto.

Cromatografia é um método de separação de substâncias e que compreende duas fases: uma é a fase estacionária e possui uma grande área de superfície e a outra é a fase móvel, que compreende um gás que percorre através da fase estacionária. A amostra é vaporizada e carregada pelo gás móvel ou gás de arraste através da coluna. Os componentes da amostra são separados um do outro de acordo com suas solubilidades a dada temperatura e afinidades pela fase estacionária (Mc NAIR e MILLER, 1997). A cromatografia é baseada na retenção do volume ou algum parâmetro intimamente relacionado. Uma vez que os parâmetros de retenção não podem confirmar a identidade dos picos cromatográficos, é comum associar um espectrômetro de massas (EM) a cromatografia gasosa (CG) para as análises qualitativas. CG/EM é a combinação sinérgica de duas técnicas analíticas importantes. Enquanto a CG separa os componentes de uma mistura ao longo do tempo, a EM traz informações que ajudam na identificação estrutural de cada componente (KITSON, LARSEN, Mc EWEN, 1996).

Os compostos odoríferos voláteis gerados no experimento foram analisados por injeção em sistema *purge and trap* (purga e armazenamento) marca Tekmar Dohrmann, modelo 3100 (Estados Unidos), equipado com frasco amostrador de 5 mL e coluna de armazenamento empacotada com os meios adsorventes Carbopack C, Carbopack B, Carboxen 1000 e Carboxen 1001, Supelco Vocarb 4000 (Estados Unidos). As medições cromatográficas foram efetuadas em cromatógrafo a gás Varian CP-3800 (Estados Unidos), equipado com coluna capilar 5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano (Chrompack CP-Sil8) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (comprimento x diâmetro

interno x espessura do filme) e espectrômetro de massas de armadilha de íons com quadrupolos tri-dimensionais (CG/EM) Varian *Saturn* 2000 (Estados Unidos), FIGURA 5.

FIGURA 5 – SISTEMA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EMPREGADO



FONTE: TECPAR (2006)

### 3.4.2 Avaliação dos compostos através da CG/EM

Após a incubação nas condições descritas, a fase aérea (*headspace*) de cada frasco de vidro foi analisada por *purge and trap*/CG-EM, baseado no protocolo analítico da U.S. EPA (1996). Uma alíquota de 5 mL da fase aérea do frasco foi coletada com seringa inerte (corpo de vidro, êmbolo de PTFE e agulha de aço inoxidável), através da punção do septo da tampa do frasco, e injetada no frasco amostrador do sistema *purge and trap*. A alíquota da amostra foi purgada com hélio para a coluna de armazenamento, mantida a 30°C, durante 11 minutos. Os compostos retidos na coluna de armazenamento foram dessorvidos por aquecimento a 245°C e transferidos por arraste com

hélio para a coluna cromatográfica. Após a separação cromatográfica, os compostos da amostra foram detectados por espectrometria de massas de armadilha de íons (*ion trap*), operado por impacto de elétrons a 70 eV, com a aquisição de íons na faixa de 10 a 350 m/z. As condições instrumentais adotadas para as medições estão expressas na TABELA 2.

TABELA 2 - PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DA CG-EM PARA AS MEDIÇÕES DE COMPOSTOS ODORÍFEROS

<b>Amostrador de purga e armazenamento (<i>purge and trap</i>)<sup>a</sup></b>	
Tempo de purga	11 minutos
Temperatura da coluna do PT durante a purga	30 °C
Temperatura da coluna durante a dessorção dos compostos armazenados	245 °C
Temperatura da linha de transferência <b><i>purge and trap/CG</i></b>	135 °C
Gás de purga/arraste	Hélio a 30 mL/min
<b>Cromatógrafo a gás – CG</b>	
Programa de aquecimento da coluna <sup>b</sup>	T = 30 °C por 5 min; 2 °C/min até 50 °C; 50 °C por 5 min; 50 °C/min até 230 °C (tempo total: 23 min)
Gás de arraste	Hélio a 30 mL/min
Temperaturas	Injetor: 230 °C; Interface CG-EM: 200 °C
Modo de injeção	Com divisor de fluxo aberto na razão de 1:20.
<b>Espectrômetro de massas – EM</b>	
Modo de aquisição	Impacto de elétrons, com varredura na faixa de aquisição de 10 a 350 m/z
Temperatura da cavidade de íons	170 °C
Temperatura da linha de transferência CG-EM	200 °C
Taxa de aquisição	1 varredura s <sup>-1</sup>
Energia de ionização	70 eV
Corrente de emissão	10 µA (ionização por elétrons)

<sup>a</sup> Equipado com coluna de armazenamento Supelco Vocab 4000 (meio adsorventes: Carbopack C, Carbopack B, Carboxen 1000 e Carboxen 1001)

<sup>b</sup> Coluna capilar fenil 5% metilsiloxano 95% - 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (comprimento x diâmetro interno x espessura do filme).

### 3.4.3 Identificação e Quantificação dos Compostos Visualizados no Cromatógrafo

A identificação de todos os compostos foi realizada através da comparação do espectro de massas e dos dados da biblioteca eletrônica NIST (2005). A quantificação foi realizada pelo método da Normalização da Área, considerado um método simples, eficaz e amplamente utilizado nas quantificações cromatográficas quando não se utiliza padrões internos (Mc NAIR e MILLER, 1997). Através dos cromatogramas, multiplica-se as áreas de cada pico, o que resulta em uma quantificação relativa percentual de cada composto nas diferentes amostras. Por não termos utilizado padrões internos na metodologia cromatográfica, entre outros motivos por:

- não conhecermos quais substâncias seriam identificadas (esperávamos novos compostos) e assim sem conhecer não havia como adquiri-los;
- dificuldade para pesagem e injeção dos padrões (sistema gasoso);
- dificuldade para aquisição dos padrões, que seria praticamente o mesmo número de substâncias identificadas, pela inviabilidade econômica;

Este método foi o único confiável para a quantificação dos compostos.

## 3.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES

### 3.5.1 Monitor Portátil de Sulfetos e Técnica Organoléptica

Após as avaliações na CG/EM, nas condições já descritas, teste organoléptico e medidas de CSV foram realizados, para confirmar a presença de odor nos frascos. Os CSV foram medidos através de um monitor portátil de sulfetos (Halimeter®) zerado com o ar ambiente previamente a cada análise. A cânula do monitor foi introduzida 4 cm no interior de cada frasco de vidro. O pico de CSV foi determinado em partes por bilhão (ppb), com os valores numéricos apresentados no display do aparelho. Utilizamos os seguintes valores referenciais: até 80 ppb = ausência de halitose; de 80 a 100 ppb=odor perceptível, as vezes considerado como halitose; 100 a 120 ppb=halitose

moderada; 120 a 150 ppb=halitose mais pronunciada; acima de 150 ppb=halitose severa (TARZIA, 2000).

Simultaneamente às medidas do Halimeter®, a avaliação organoléptica foi realizada utilizando o método Organoléptico Vieira e Falcão (FALCÃO e VIEIRA, 2003; VIEIRA e FALCÃO, 2007). Esse método é baseado no grau de propagação do odor, com escala de 0-4 onde: 0=ausência de odor; 1=odor natural; 2=halitose da intimidade (distância de 15 cm); 3=halitose do interlocutor (distância de 50 cm); 4=halitose social (distância de + de 50 cm). Dois examinadores conduziram o teste. O examinador 1 foi responsável pela leitura dos escores 0 a 3. Ao abrir o frasco de vidro, posicionava-se à distância de 50 cm deste, e quando o odor propagava até este ponto, o escore registrado era 3. Se o examinador 1 não sentia nenhum odor neste ponto, aproximava-se para a distância de 15 cm do frasco e aí registrava o escore 2. O examinador 2 posicionava-se a distância aproximada de 1 metro do frasco e quando o odor propagava até este ponto o escore registrado era 4.

## 4. RESULTADOS

Este trabalho foi executado em 27 frascos de vidro contendo meio de cultura BHI e suspensão bacteriana da amostra de dorso lingual, acrescido com os diferentes substratos. Cada conjunto de 3 frascos recebeu o nome do substrato adicionado, sendo: frasco L-cistina, L-cisteína, L-metionina, L-ornitina, L-arginina, L-lisina, L-triptofano, L-histidina e extrato de carne. O conjunto em triplicata do frasco controle foi exatamente igual às demais amostras, sem a adição dos substratos.

Com o decorrer do estudo, na fase da identificação dos gases no cromatógrafo observou-se uma discrepância entre as triplicatas. Apesar do perfil geral obtido das amostras ter sido semelhante, com um composto maioritário e os demais em menores proporções, em algumas amostras esses compostos minoritários foram encontrados somente em pequenos traços o que impossibilitou sua identificação, assim optamos por eleger somente uma amostra de cada triplicata, aquela que forneceu mais informações. Isso comprometeu a análise do modelo em triplicata e foi abandonado. Essa discrepância entre as triplicatas pode ser explicada por falha no processamento microbiológico, falhas durante a condução da cromatografia gasosa ou outros fatores que envolveram o estudo. Dessa forma, os resultados apresentados são de 9 frascos com substratos e um frasco controle.

### 4.1 ÍNDICE DE SABURRA LINGUAL DO PACIENTE FONTE

O escore de saburra lingual do paciente fonte foi grau 2, onde a espessura obteve escore 1 (fina saburra com papilas linguais visíveis) e a área obteve escore 2 (que é representado pela saburra cobrindo de  $1/3$  a  $2/3$  do dorso lingual), no caso do estudo ocupando o terço posterior lingual.

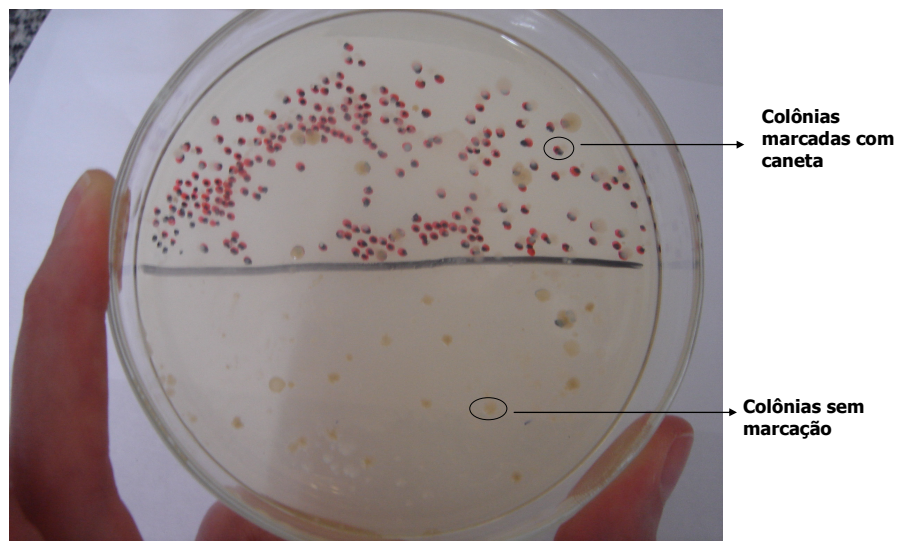
### 4.2 CONCENTRAÇÃO DAS UFC/MG DA SABURRA LINGUAL

Após as 48 horas de incubação, realizamos as contagens em metade da placa diluída a  $10^{-6}$  e encontramos 242 colônias, número que multiplicado por 2 (para placa total), resultou em 484 colônias nesta placa. Multiplicando esse número pelo fator de diluição, chegamos a 484000000



UFC em 0,5 mL da suspensão bacteriana e corrigindo para os 50 mL, encontramos 48400000000 ou  $4,84 \times 10^{10}$  UFC nos 23,3 mg de saburra lingual utilizados para formar essa suspensão. Corrigimos o cálculo para finalmente, determinar o número de UFC por mg de saburra e encontramos  $2,07 \times 10^9$  UFC/mg de saburra representando a diversidade microbiana encontrada no dorso da língua, a partir da solução mãe e aqui visualizado na FIGURA 6.

FIGURA 6 - CONTAGEM DAS UFC/MG DA SABURRA LINGUAL



FONTE: a autora (2007)

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Através do Método *Checkerboard DNA-DNA* hybridization nossa amostra foi positiva para as 40 espécies bacterianas testadas. Os resultados foram dados em contagem absoluta com os sinais de detecção situados entre  $< 10^5$  até  $> 10^6$  como mostra a TABELA 3.

TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DA AMOSTRA DO DORSO LINGUAL PELO MÉTODO  
CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION

ESPÉCIES	SINAL de DETECÇÃO	COMPLEXOS
<i>A. israeli</i>	1	
<i>A. naeslundii I</i>	2	
<i>A. gerencseriae</i>	2	Azul
<i>A. naeslundii II</i>	3	
<i>A. odontolyticus I</i>	3	
<i>V. parvula</i>	3	Roxo
<i>S. intermedius</i>	1	
<i>S. mitis</i>	3	
<i>S. oralis</i>	3	
<i>S. sanguinis</i>	3	Amarelo
<i>S. Gordonii</i>	3	
<i>A. actinomycetemcomytans a</i>	2	
<i>E. corrodens</i>	2	
<i>C. ochracea</i>	2	
<i>C. gingivalis</i>	3	Verde
<i>C. sputigena</i>	3	
<i>M. micros</i>	1	
<i>E. nodatum</i>	1	
<i>C. gracilis</i>	1	
<i>C. rectus</i>	2	
<i>C. showae</i>	2	
<i>S. constellatus</i>	3	
<i>F.nuc sp nucleatum</i>	3	
<i>F.nuc sp polymorphum</i>	3	
<i>F.nuc sp vincentii</i>	3	
<i>F. periodonticum</i>	4	
<i>P. intermedia</i>	4	Laranja
<i>P. nigrescens</i>	4	
<i>T. denticola</i>	1	
<i>P. gingivalis</i>	3	Vermelho
<i>T. forsythia</i>	5	
<i>G. morbillorum</i>	2	
<i>P. acnes I</i>	2	
<i>T. Socranskii</i>	3	
<i>E. saburreum</i>	3	
<i>S. noxia</i>	3	
<i>S. anginosus</i>	3	
<i>L. buccalis</i>	3	
<i>N. mucosa</i>	4	Outros
<i>P. melaninogenica</i>	4	

Legenda  
 0 = ausência de sinal  
 1 = sinal < 10<sup>5</sup>  
 2 = sinal > 10<sup>5</sup>  
 3 = sinal entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup>  
 4 = sinal a 10<sup>6</sup>  
 5 = sinal > 10<sup>6</sup>

FONTE: a autora (2007)

0 1 2 3 4 5

A saburra lingual foi colonizada por bactérias predominantemente Gram-negativas anaeróbicas. *Veillonella parvula*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella melaninogenica* foram detectadas em contagem absoluta acima de  $10^6$ , seguidas por *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Neisseria mucosa* e *Prevotella intermedia* com contagem de  $10^6$ . *T. forsythia* é patógeno periodontal pertencente ao complexo vermelho, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, seu desenvolvimento em cultivo é fastidioso e está fortemente relacionado com periodontites severas. *V. parvula* é coco Gram-negativo, anaeróbio estrito, capaz de produzir ácido acético e ácido propiônico, aparentemente desprovida de patogenicidade, é espécie ubíqua pertencente ao complexo roxo. *P. melaninogenica* espécie formada por bacilos Gram-negativos, microrganismo anaeróbio estrito, isolado de bolsas periodontais ativas e canais radiculares, não entra na classificação dos complexos. *P. intermedia* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, espécie proteolítica e produtora de indol. Como existem evidências da sua participação na gengivite por alteração hormonal, na Ulcerativa Necrosante (GUN) e em bolsas periodontais que não apresentaram perda óssea recente, é um possível patógeno periodontal. Faz parte do complexo laranja a sua presença a nível de  $10^6$  é dado importante. *P. nigrescens* é espécie formada por bacilos Gram-negativos, anaeróbio estrito, pertence ao complexo laranja, sua participação na doença periodontal tem sido avaliada. *F. periodonticum* é bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, é proteolítico produtor de indol e faz parte do complexo laranja. *N. mucosa* é coco Gram-negativo, aeróbio e não pertencente aos complexos microbianos (De LORENZO e MAYER, 2004).

Para completar o complexo vermelho, em menores números encontramos *P. gingivalis* que foi detectado com sinal de  $10^5$ , é um cocobacilo Gram-negativo e apesar de ser anaeróbio obrigatório, é relativamente aerotolerante, é considerada a bactéria mais proteolítica dentre as Gram-negativas bucais e está fortemente associada com periodontite crônica. *T. denticola* é um Gram-negativo espiralado anaeróbio estrito, portador de intensa mobilidade e parece ser a mais proteolítica da espécie, foi detectado com um sinal menor que  $10^5$ . A presença dos 3 componentes do complexo vermelho no dorso lingual da paciente enfatiza a importância da língua como reservatório dos patógenos periodontais, está de acordo com a literatura (ROLDAN,

HERRERA, SANZ, 2003) e serve como mais um alerta para os profissionais da área, de que a abordagem da limpeza mecânica lingual deve ser rotina nos consultórios e clínicas de Periodontia, principalmente. Dos possíveis patógenos periodontais, *F. nucleatum* com as subespécies *vincentii*, *polymorphum* e *nucleatum* são todos bacilos Gram-negativos, anaeróbios estritos relativamente aerotolerantes, fazem parte do complexo laranja, são proteolíticos produtores de indol e sulfeto de hidrogênio, foram detectados com sinal entre  $10^5$  e  $10^6$ . *C. rectus* é bacilo Gram-negativo microaerófilo, com certa mobilidade devido ao flagelo polar. Foi detectado na proporção de  $10^5$  na amostra, faz parte do complexo laranja e os indícios de frequência aumentada nas bolsas periodontais ativas o tornam um sério candidato à periodontopatógeno. A bactéria *E. corrodens* foi detectada numericamente em  $10^5$ , é Gram-negativa, bacilo anaeróbico facultativo, faz parte do complexo verde, é isolada de lesões periodontais progressivas e causa reabsorções ósseas alveolares em ratos gnotobiotas. *M. micros* foi detectado com sinal de  $10^5$ , faz parte do complexo laranja é um coco Gram-positivo, proteolítico, isolado de estágios avançados de periodontite e infecções periapicais. *S. intermedius* é espécie Gram-positiva, anaeróbica facultativa, pertencente ao complexo amarelo, foi encontrada em proporções menores que  $10^5$  e é relacionada com doença periodontal, já recuperada de abscessos hepáticos e cerebrais, endocardites, peritonites e apendicites. As espécies *C. ochracea* ( $10^5$ ), *C. gingivalis* (entre  $10^5$  e  $10^6$ ) e *C. sputigena* ( $10^5$  e  $10^6$ ) são todas possíveis periodontopatógenos, bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos dependentes de  $\text{CO}_2$  dotados de grande mobilidade (De LORENZO e MAYER, 2004), pertencentes ao complexo verde.

#### 4.4 ANÁLISE NA CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As figuras a seguir apresentam os cromatogramas, onde visualizamos as curvas de identificação, sendo cada pico correspondente a um composto produzido. Entende-se por parte 2 como sendo a continuação do cromatograma parte 1. Entende-se por sangramento de coluna a presença de compostos contendo silício contidos na fase estacionária da CG e que são removidos pela fase móvel, representando uma contaminação interna do

sistema cromatográfico. Esta contaminação não interfere nos resultados apresentados.

FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO CONTROLE, SEM ADIÇÃO DE SUBSTRATOS, PARTE 1

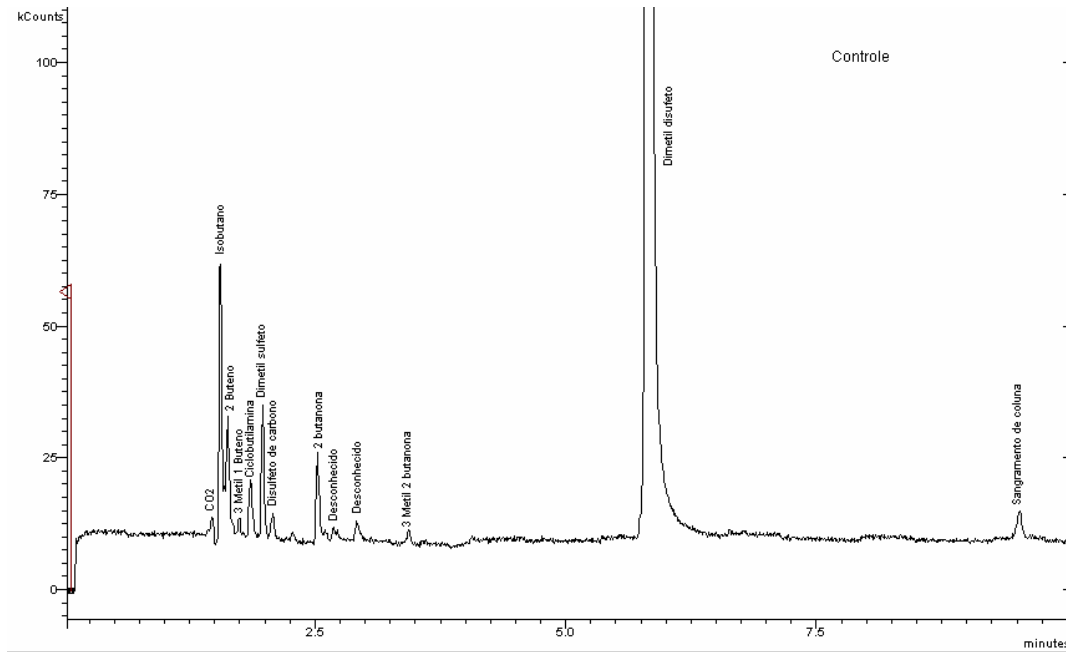


FIGURA 8 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO CONTROLE, SEM ADIÇÃO DE SUBSTRATOS, PARTE 2

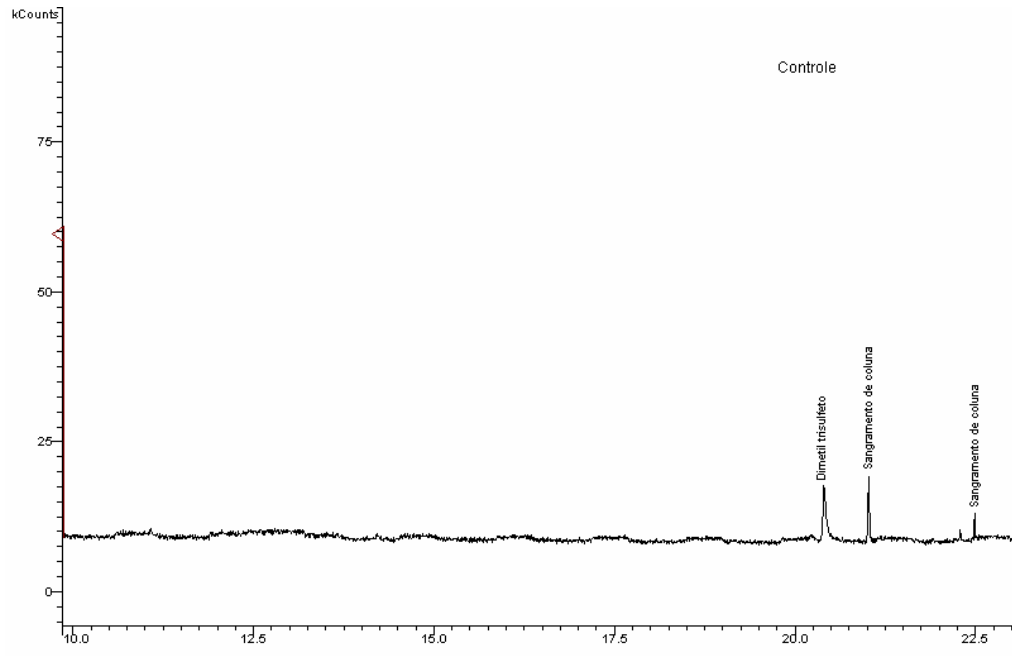


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTINA, PARTE 1

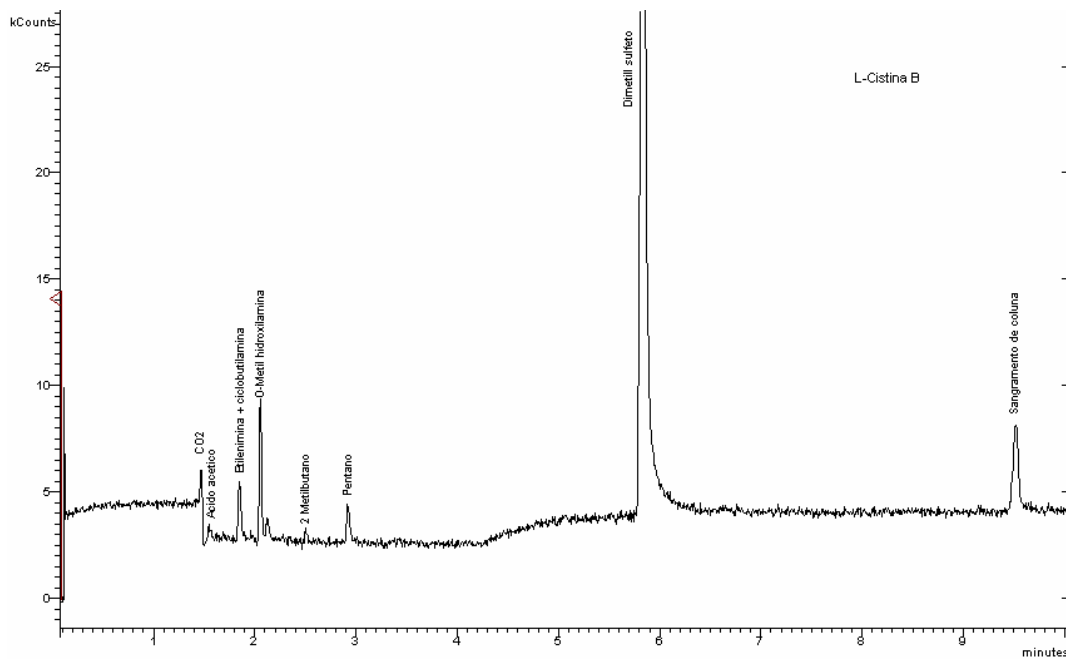


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTINA, PARTE 2

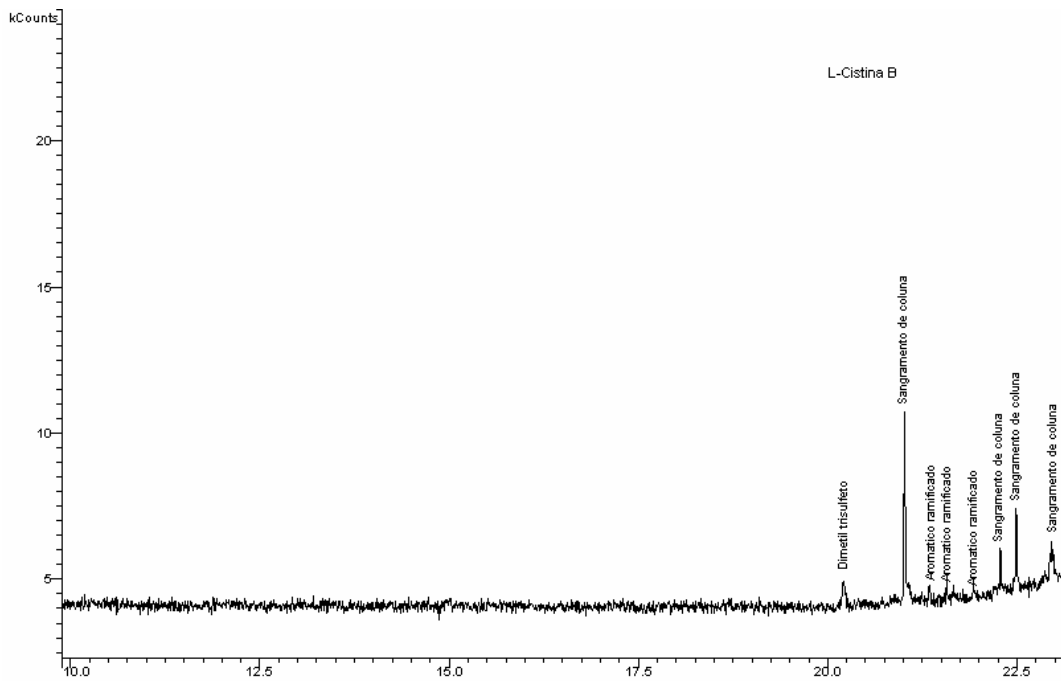


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA, PARTE 1

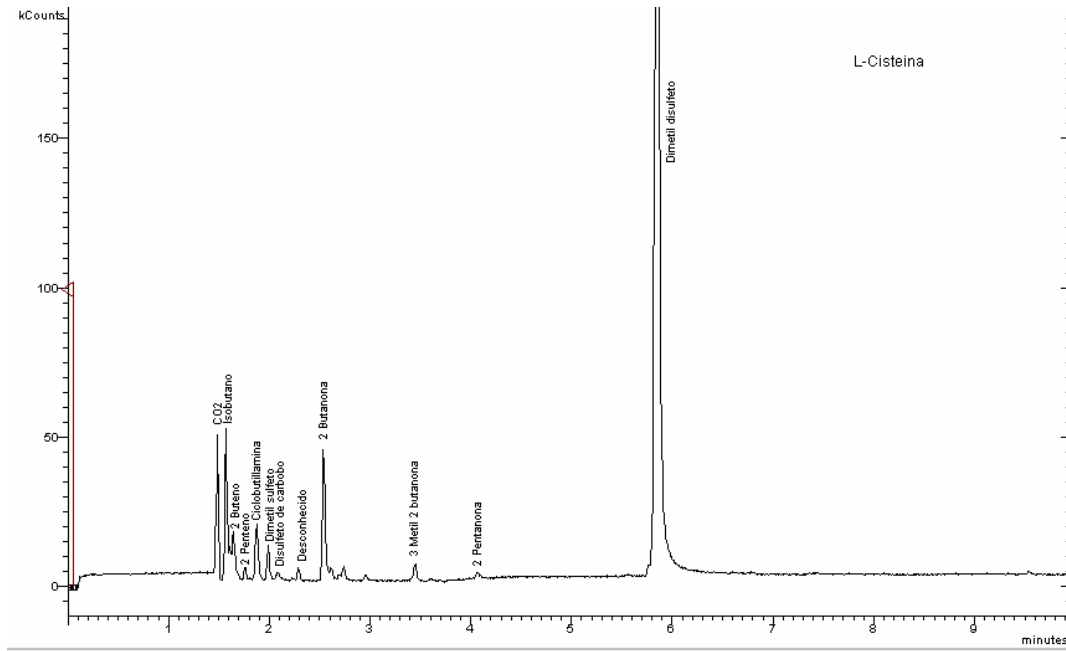


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA, PARTE 2

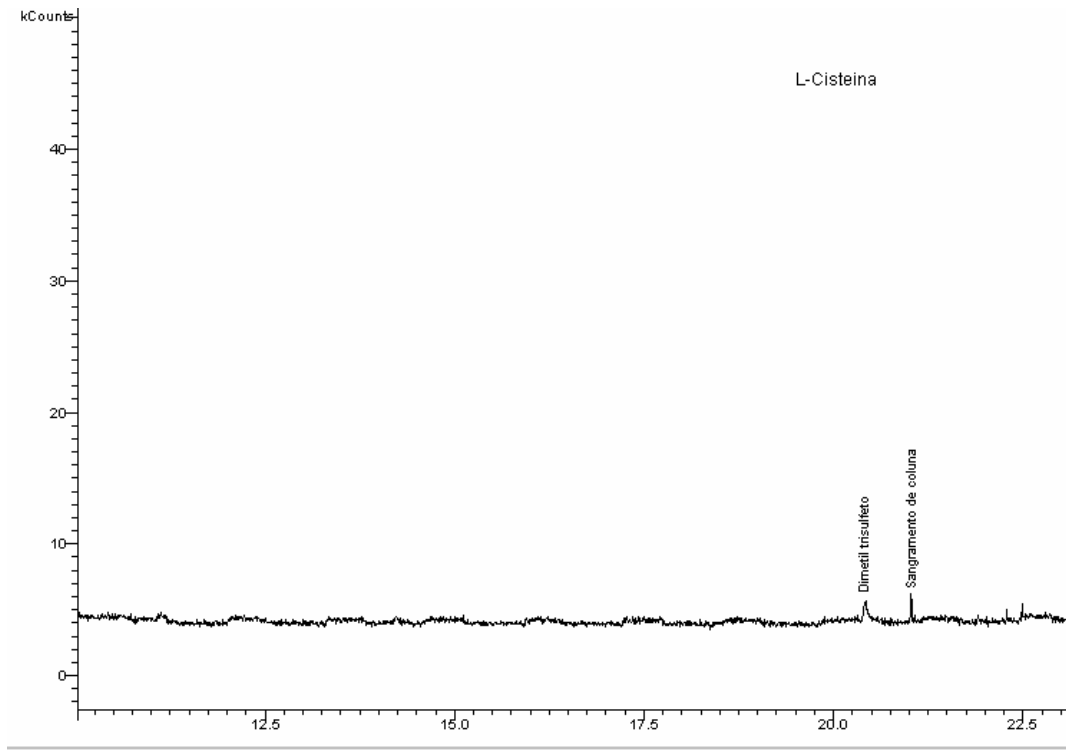




FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-METIONINA, PARTE 1

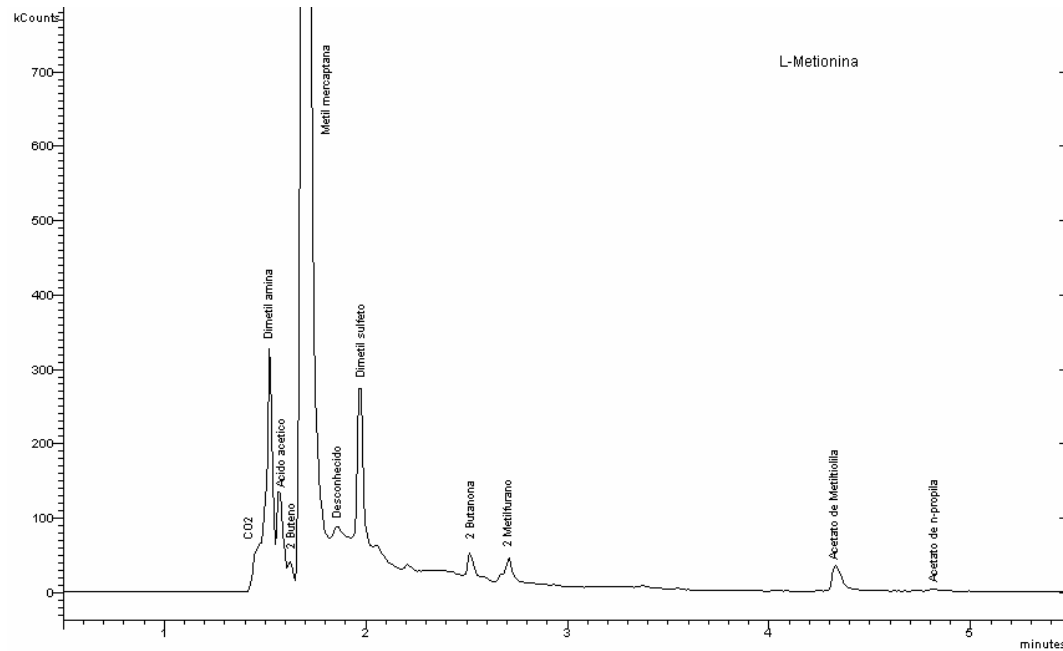


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-METIONINA, PARTE 2

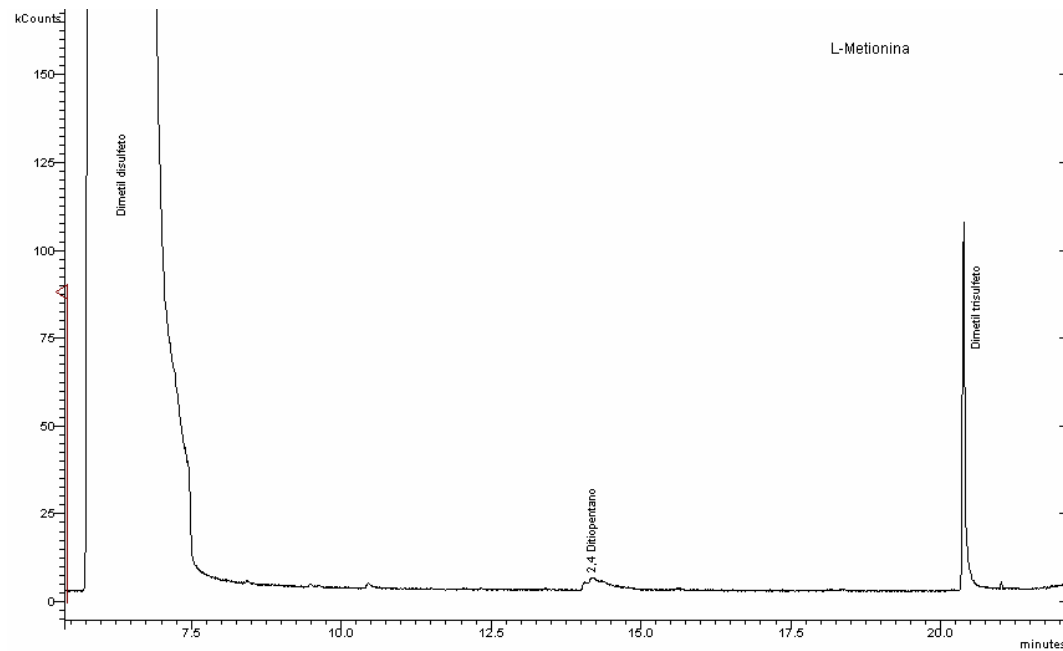


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ORNITINA

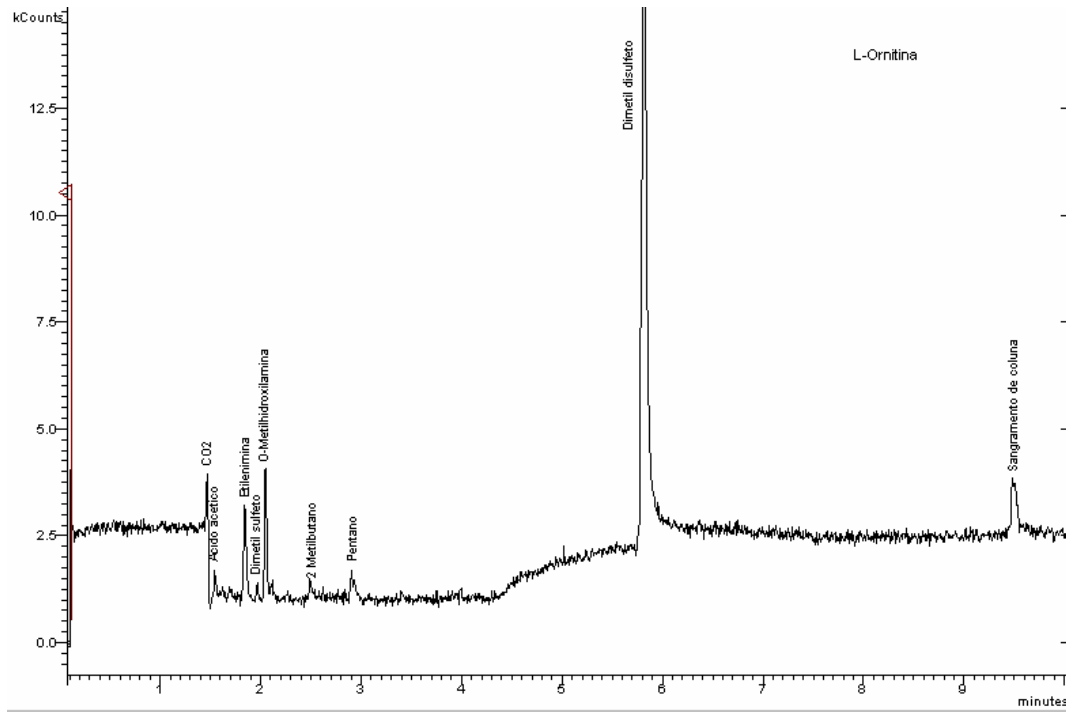


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ARGININA, PARTE 1

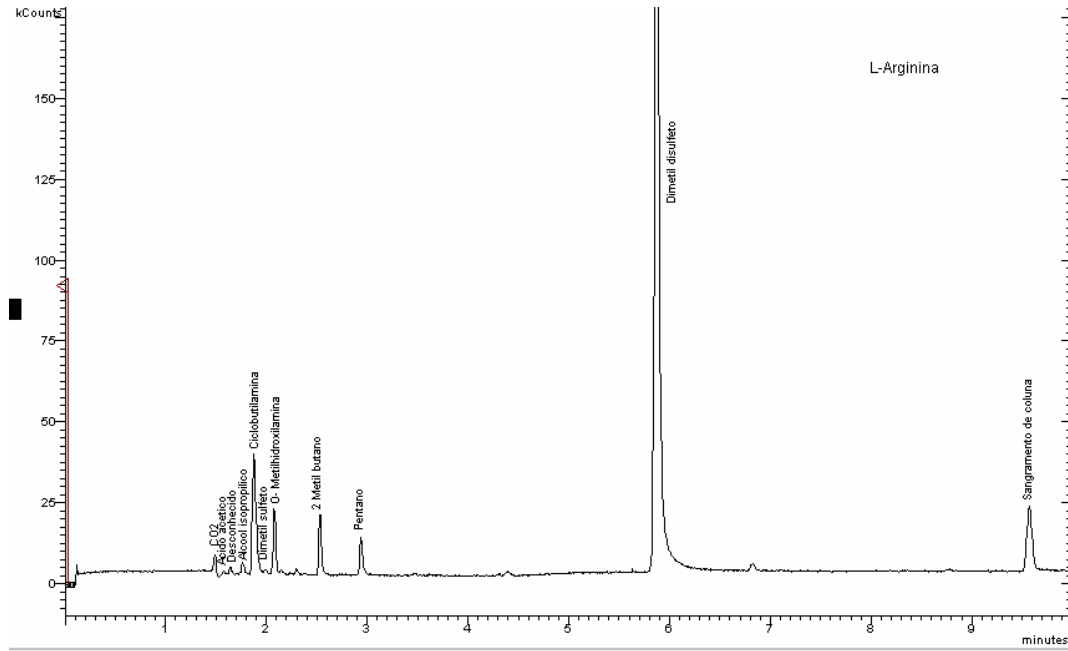


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ARGININA, PARTE 2

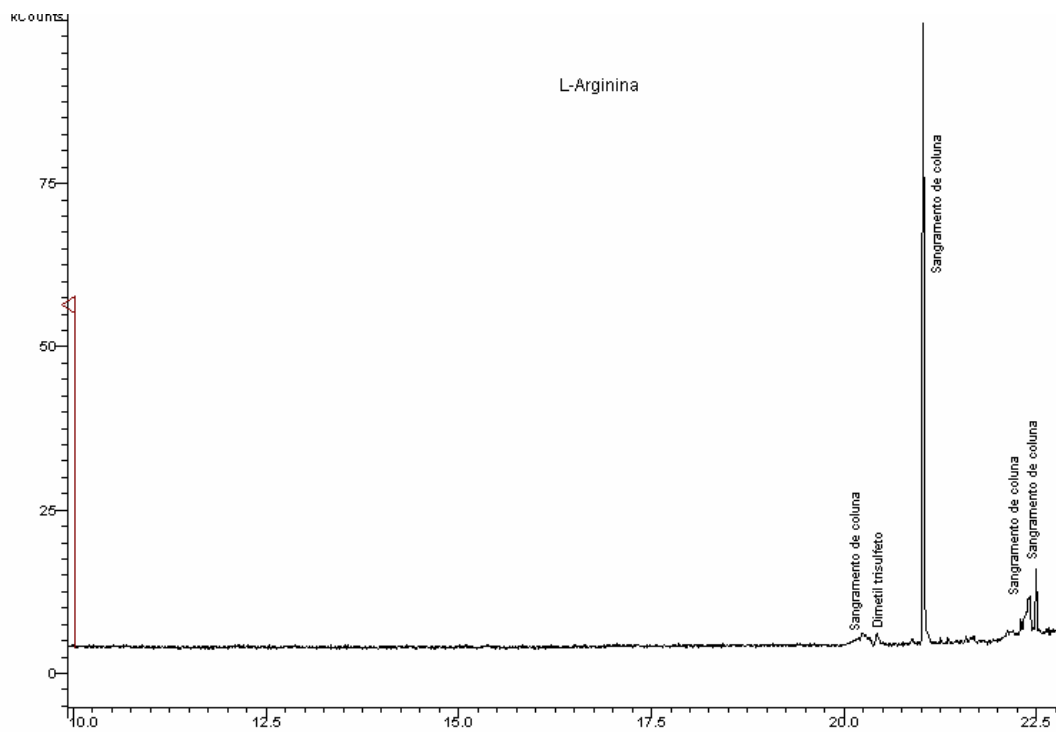


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-LISINA, PARTE 1

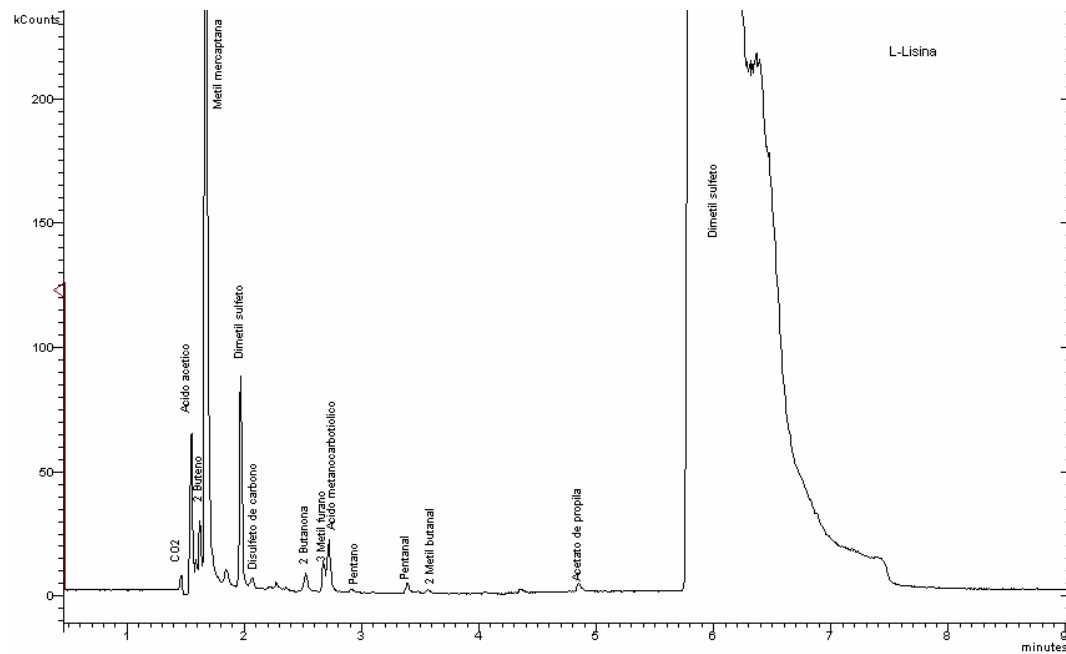


FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-LISINA, PARTE 2

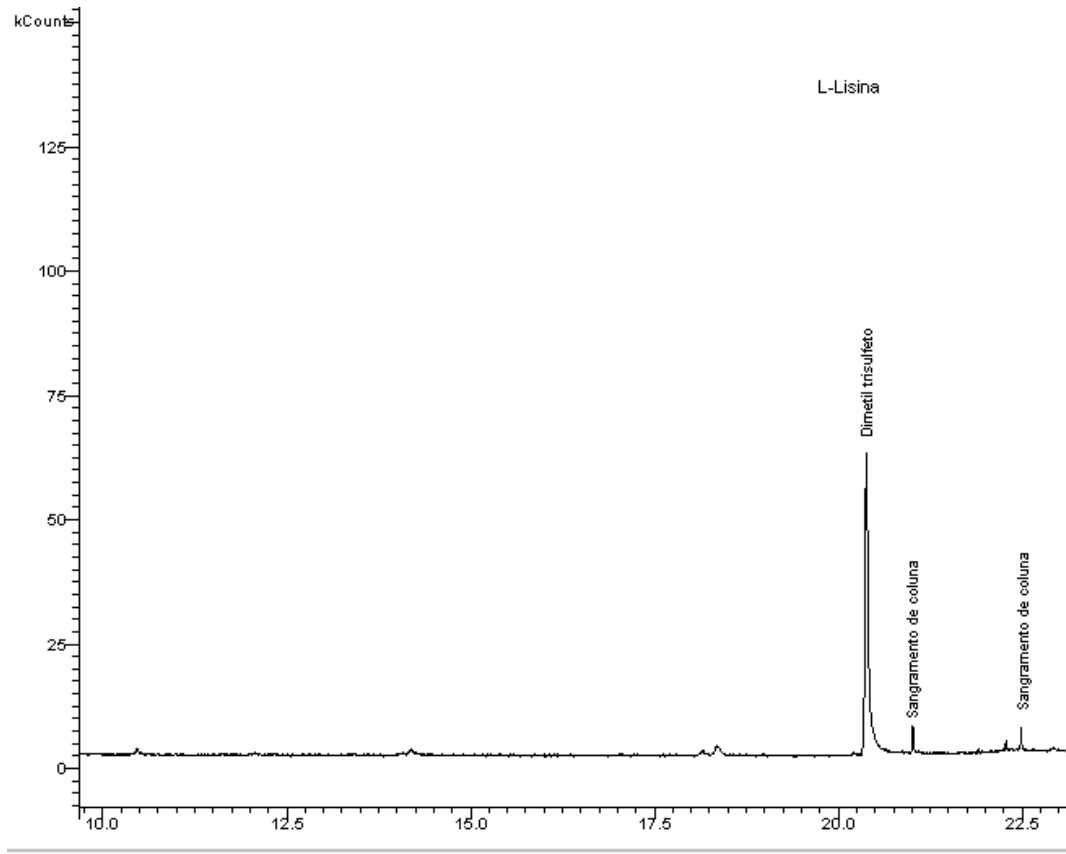


FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-TRIPTOFANO

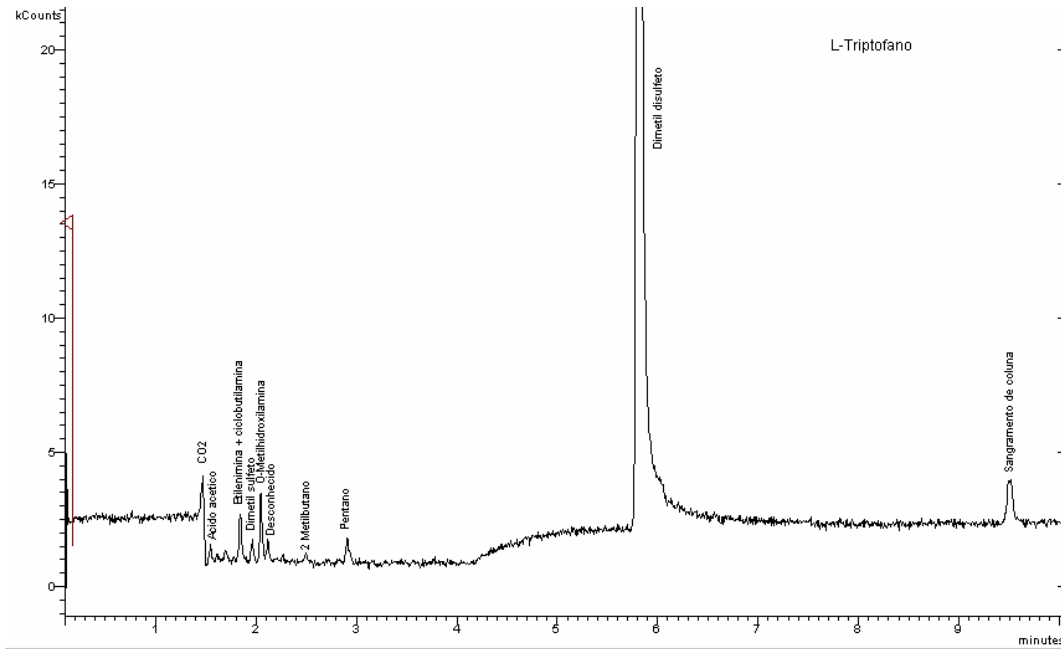


FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-HISTIDINA

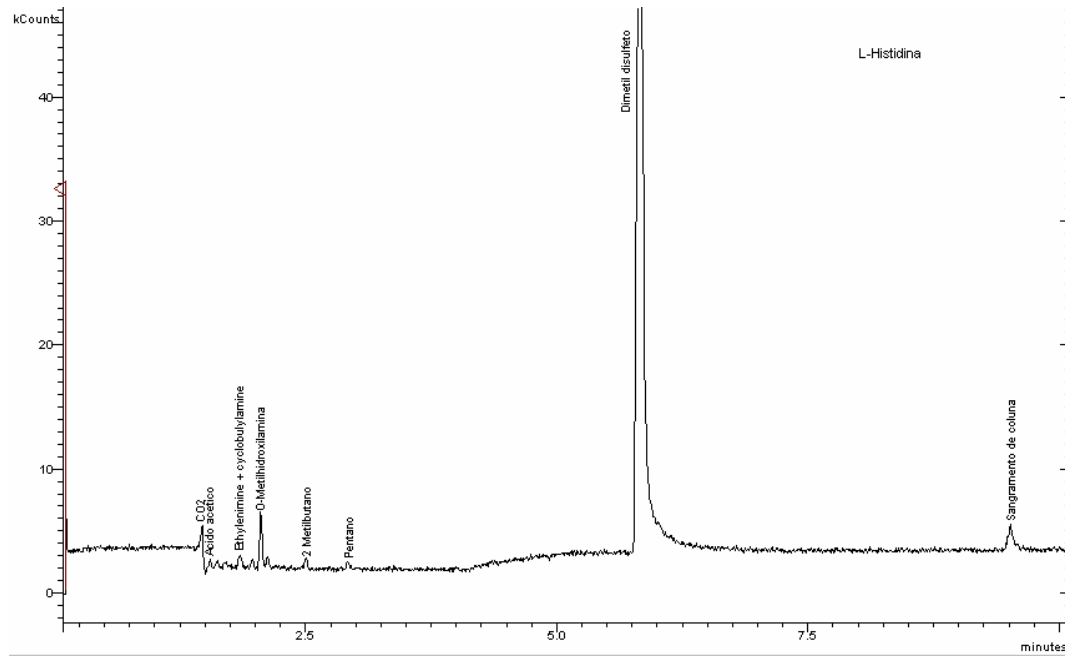
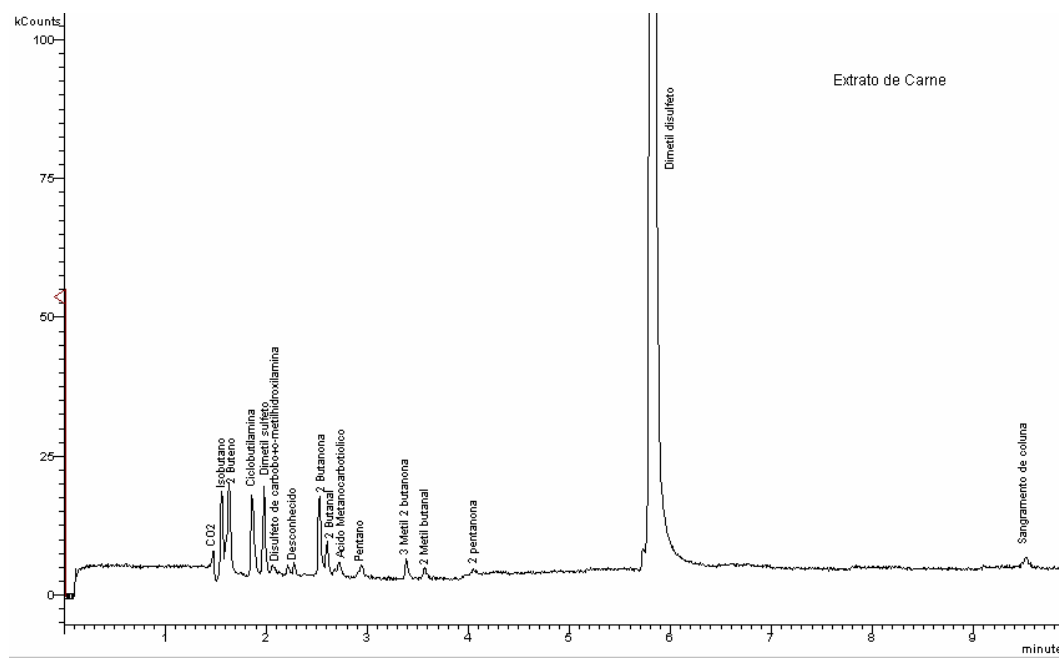


FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE CARNE



Foram identificados um total de 33 compostos, sendo: dimetilamina; isobutano; ácido acético; 2-buteno; 2-penteno; 3-metil 1 buteno (produzido somente no frasco controle); metilmercaptana; álcool isopropílico; ciclobutilamina; etilenimina; dimetilsulfeto; dissulfeto de carbono; O-metilhidroxilamina; 2-metil butano; 2-butanona; 2-butanol; 3-metilfurano; 2-metilfurano; ácido metanocarbotiólico; pentano; pentanal; 3-metil 2 butanona; 2-metil butanal; 2-pentanona; acetato de metiltiolila; acetato de propila; dimetildisulfeto; 2,4 ditiapentano; dimetiltrisulfeto e 4 tipos de aromáticos ramificados.

A TABELA 4 evidencia todos os compostos identificados, com os respectivos tempos de retenção e íons de quantificação.

TABELA 4 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS, COM OS RESPECTIVOS ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO

Compostos <sup>a</sup>	Fórmula	Massa molar	TR, min <sup>b</sup>	Íons, m/z <sup>c</sup>
Dimetilamina	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N	45	1,52	<b>45</b> , 44, 28
Isobutano	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	58	1,56	<b>58</b> , 41, 43
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60	1,59	<b>60</b> , 43, 45
2-buteno	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	56	1,63	<b>56</b> , 41, 39, 27
Metilmercaptana	CH <sub>4</sub> S	48	1,70	<b>48</b> , 47, 45
3-metil 1 buteno	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	1,74	<b>70</b> , 55, 42, 29
2-penteno	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	1,76	<b>70</b> , 55, 42, 29
Álcool isopropílico	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60	1,77	<b>60</b> , 59, 45
Ciclobutilamina	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N	71	1,88	<b>71</b> , 43, 42
Etilenimina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N	43	1,81	<b>43</b> , 42, 28
Dimetilsulfeto	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S	62	1,98	<b>62</b> , 47, 45, 35
O-metilhidroxilamina	CH <sub>5</sub> NO	47	2,07	<b>47</b> , 32, 29
Dissulfeto de carbono	CS <sub>2</sub>	76	2,10	<b>76</b> , 44, 32
2-metil butano	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	72	2,50	<b>72</b> , 43, 57, 42
2-butanona	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72	2,52	<b>72</b> , 43, 57
2-butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74	2,60	<b>74</b> , 45, 59
2-metilfurano	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O	82	2,67	<b>82</b> , 81, 53
3-metilfurano	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O	82	2,71	<b>82</b> , 81, 53
Ac. metanocarbotiólico	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OS	76	2,72	<b>76</b> , 43, 61
Pentano	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	72	2,90	<b>72</b> , 41, 57
Pentanal	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	3,40	<b>86</b> , 44, 58
3-metil 2 butanona	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	3,44	<b>86</b> , 43, 41, 71
2-metil butanal	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	3,57	<b>86</b> , 41, 57, 29
2-pentanona	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	4,06	<b>86</b> , 43, 71
Acetato de metiltiolila	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS	90	4,33	<b>90</b> , 43, 75
Acetato de propila	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102	4,81	<b>102</b> , 43, 61, 73
Dimetildisulfeto	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	94	5,80	<b>94</b> , 79, 45
2,4 ditiapentano	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	108	14,07	<b>108</b> , 61, 45
Dimetiltrisulfeto	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	126	20,40	<b>126</b> , 45, 79, 111
Aromáticos ramificados	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134	21,58	<b>134</b> , 105, 91, 77
			<sup>a</sup>	
			21,90	

FONTE: a autora (2007)

<sup>a</sup> Compostos apresentados na ordem de eluição cromatográfica.

<sup>b</sup> TR – tempo de retenção aproximado.

<sup>c</sup> Íon molecular e íons secundários do espectro de massas, apresentados na ordem decrescente de abundância.



#### 4.4.1 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS

Os compostos produzidos (TABELA 4) foram selecionados segundo os critérios abaixo e agrupados na FIGURA 23. Esses compostos serão os apresentados nos próximos resultados.

- em quantidades de produção (1% e/ou acima em pelo menos 1 amostra). Foram 12 compostos.
- em frequência de aparecimento (em 4 ou mais amostras). Foram 8 compostos

FIGURA 23 - COMPOSTOS MAIS FREQUENTES E PRODUZIDOS EM MAIOR PORCENTAGEM NAS AMOSTRAS

	Controle %	Cistina %	Cisteína %	Metionina %	Ornitina %	Arginina %	Lisina %	Triptofano %	Histidina %	Extrato de carne %
Isobutano	1,01%		3,15%							1,15%
Ácido acético		0,85%		0,17%	2,41%	0,55%	0,21%	0,64%	0,50%	
2-buteno	0,35%		0,89%	0,01%			0,07%			1,20%
Metilmercaptana				22,56%			1,43%			
Álcool isoprop.						1,64%				
Ciclobutilamina	0,32%	1,15%	3,77%			9,75%		0,72%	0,26%	2,65%
Etilenimina		1,15%			8,39%			0,72%	0,26%	
Dimetil sulfeto	0,58%		1,10%	0,20%	0,93%	0,10%	0,20%	0,38%		1,21%
O-metilhidroxilamina		13,08%			5,83%	2,34%		1,04%	1,18%	
2-metilbutano		0,27%			1,19%	2,03%		0,11%	0,23%	
2-butanona	0,88%		8,60%	0,10%			0,04%			2,58%
Pentano		1,07%			1,40%	1,54%		0,46%	0,22%	0,26%
Dimetildisulfeto	95,83%	74,5%	72,18%	76,31%	65,75%	80,5%	97,42%	93,09%	94,92%	88,67%
Dimetiltrisulfeto	0,33%	0,18%	0,31%	0,24%		0,41%	0,36%			

FONTE: a autora (2007)

Os compostos selecionados no estudo, agora são evidenciados segundo sua função química (TABELA 5).

TABELA 5 - COMPOSTOS E SUA FUNÇÃO QUÍMICA

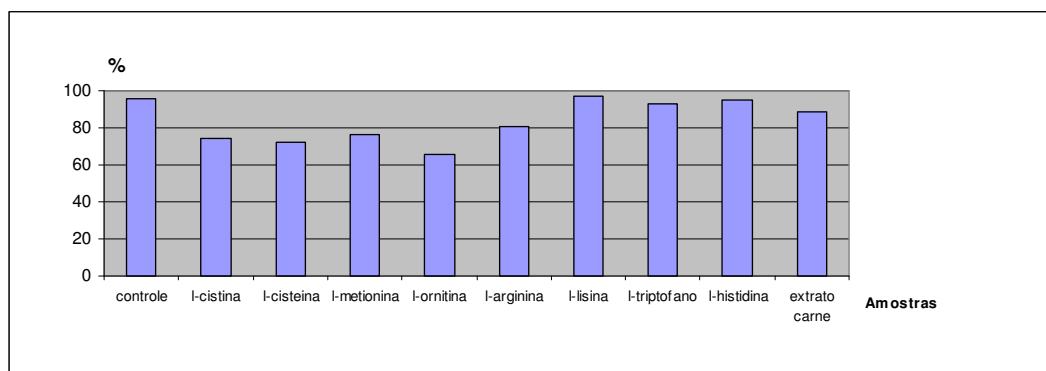
COMPOSTO	FUNÇÃO ORGÂNICA
Isobutano	hidrocarboneto – alceno
Ácido acético	função oxigenada – ácido carboxílico
2-buteno	hidrocarboneto – alceno
Metilmercaptana	função nitrogenada – tiocomposto
Álcool isopropílico	função oxigenada – álcool (-OH)
Ciclobutilamina	função nitrogenada – amina
Etilenimina	função nitrogenada – amina (-NH <sub>2</sub> )
Dimetilsulfeto	função nitrogenada – tiocomposto (-S)
O-metilhidroxilamina	função nitrogenada – amina (-NH <sub>2</sub> )
2-metil butano	hidrocarboneto – alceno ramificado
2-butanona	função oxigenada – cetona (-C=O)
Pentano	hidrocarboneto – alceno
Dimetildisulfeto	função nitrogenada – tiocomposto (-S)
Dimetiltrisulfeto	função nitrogenada – tiocomposto (-S)

FONTE: a autora (2007)

#### 4.4.2 Produção do composto Dimetildissulfeto

Apesar do dimetildissulfeto ser um CSV, os resultados da sua expressiva produção são apresentados separadamente dos demais e com antecedência a eles. Esse composto foi produzido em todas as amostras de forma qualitativa e quantitativa significativa, como é visualizado pelo GRÁFICO 1.

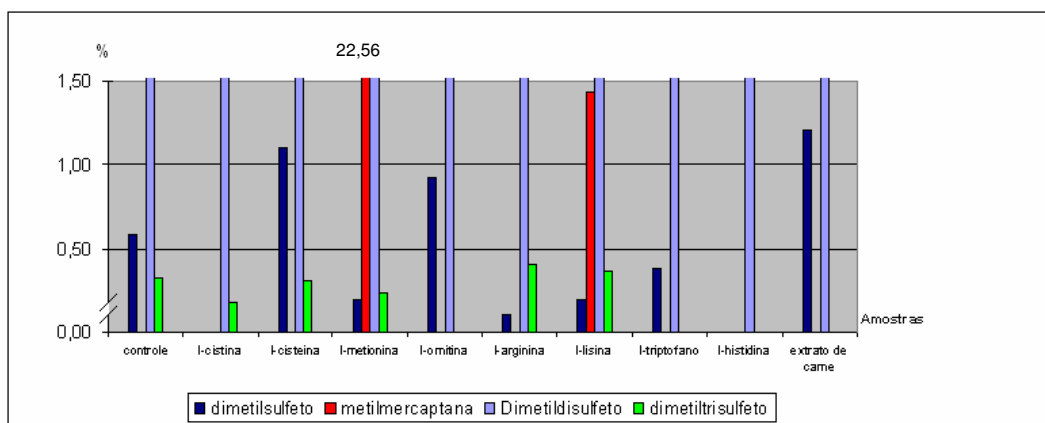
GRÁFICO 1 - PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DO COMPOSTO DIMETILDISULFETO A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL



#### 4.4.3 Produção dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

Os compostos derivados do enxofre foram agrupados no GRÁFICO 2. Não incluímos a escala completa de porcentagem dos compostos produzidos, pois dessa forma somente o composto dominante (dimetildisulfeto) ficaria evidente e os demais compostos produzidos em menor escala não apareceriam no gráfico, por isso o corte na escala. A partir deste gráfico discutiremos os compostos dimetilsulfeto, metilmercaptana e dimetiltrisulfeto.

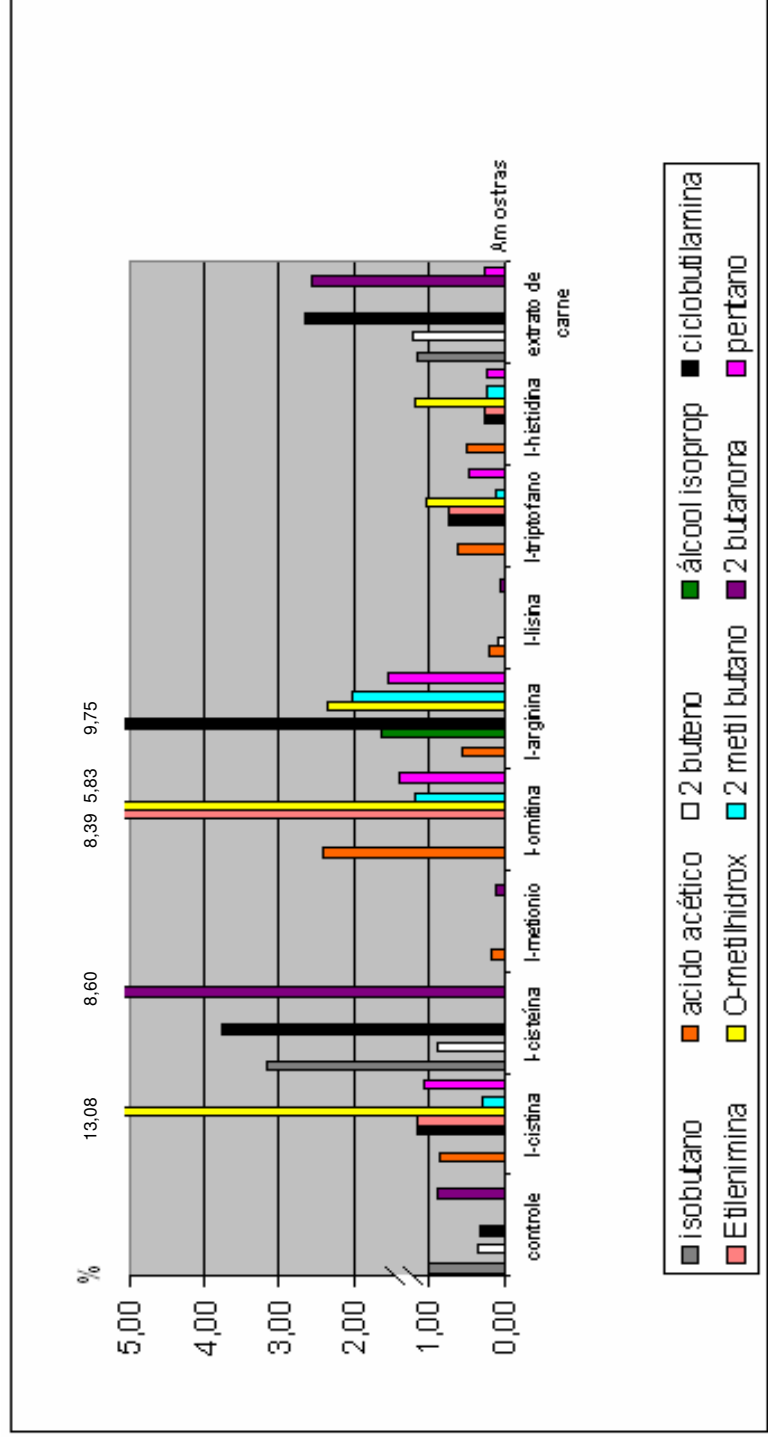
GRÁFICO 2- PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DOS CSV A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL



#### 4.4.4 Produção de compostos Orgânicos Voláteis (COV)

Os COV selecionados foram agrupados no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 - PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DOS COV A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL



#### 4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES

Todos os frascos de vidro foram avaliados individualmente através do Halimeter® e do Teste Organoléptico Vieira e Falcão (FALCÃO e VIEIRA, 2003; VIEIRA e FALCÃO, 2007). Todas as amostras apresentaram CSV detectáveis pelo Halimeter®. O Teste Organoléptico foi também positivo, obtendo escore 4 em todas as amostras, que é o maior grau de propagação do odor deste método, tratando-se portanto de gases extremamente odoríferos. Esses dois resultados em conjunto, indicam que houve a produção de compostos realmente odoríferos neste estudo. A produção de CSV foi variável entre as amostras. Os valores registrados pelo Halimeter® foram de 102 a 200 ppb entre os frascos de vidro enriquecidos com aminoácidos e de 100 ppb no frasco controle. A tabela 6 mostra as medidas de CSV realizadas pelo Halimeter, em ppb e os escores registrados pelo teste Organoléptico de Vieira e Falcão.

TABELA 6. MEDIDAS DE CSV REALIZADAS PELO HALIMETER, EM PPB E ESCORES REGISTRADOS PELO TESTE ORGANOLÉPTICO VIEIRA e FALCÃO

Amostras	Pico de CSV em ppb*	Escore – Vieira e Falcão
L-Metionina	120	4
L-Cisteína	179	4
L-Cistina	169	4
L-Arginina	200	4
L-Histidina	160	4
L-Lisina	103	4
L-Ornitina	102	4
L-Triptofano	179	4
Extrato de carne	130	4
Controle	100	4

\* partes por bilhão

FONTE: a autora (2007)

A tabela 7 abaixo mostra os achados do Halimeter® e os achados do método organoléptico e a correlação dos dois métodos com o significado clínico dos diferentes graus de halitose.

TABELA 7. SIGNIFICADO CLÍNICO E VALORES REFERENCIAIS DAS MEDIDAS DO HALIMETER E DOS ESCORES DO TESTE ORGANOLÉPTICO VIEIRA e FALCÃO.

Significado Clínico	Halimeter*	Vieira e Falcão
Ausência de halitose	< 80	0
Odor natural	80 - 100	1
Halitose da intimidade	100 - 120	2
Halitose do interlocutor	120 - 150	3
Halitose social	> 150	4

\* partes por bilhão (ppb)

FONTE: FALCÃO e VIEIRA (2003).

## 5- DISCUSSÃO

A saburra lingual da paciente fonte serviu como amostra para o desenvolvimento deste trabalho *in vitro* focado nas bases biológicas da formação da halitose. Dessa forma o projeto do experimento envolveu 3 aspectos do mau odor, sendo a microbiota lingual - que recentemente vem sendo citada nos trabalhos como a grande responsável por esta condição, a utilização preferencial de alguns substratos protéicos, culminando com a conseqüente elaboração por parte desta microbiota, dos esperados compostos odoríferos. O propósito de termos escolhido a saburra de língua de um paciente portador de doença periodontal como amostra para este trabalho é que a língua por si só, com sua anatomia e localização, é um excelente sítio para o desenvolvimento da microbiota Gram-negativa que escolhemos trabalhar. Sabe-se que um dos fatores que modificam a composição e quantidade de saburra lingual é a doença periodontal. A saburra do paciente periodontal é muito mais rica em células epiteliais descamadas e em número de microrganismos, principalmente os anaeróbicos Gram-negativos (YAEGAKI e SANADA, 1992).

Para melhor caracterizar a amostra, a saburra lingual foi classificada segundo OHO et al., 2001 e TANAKA et al., 2004 em escores de 0 a 3, através da multiplicação do escore visual da área da saburra lingual pelo escore visual da espessura deste material. Essa classificação é muito mais completa do que a utilizada por autores como MIYAZAKI et al. (1995) que classificaram a saburra lingual como presente ou ausente em 3 áreas, não citando a espessura desta. Outra classificação é a utilizada por WINKEL et al. (2003) que dividiram a língua em 6 áreas classificando cada uma independentemente, segundo os escores de espessura somente. O escore final da saburra em questão foi 2, obtido pela multiplicação da espessura escore 1, que é uma fina saburra deixando as papilas linguais visíveis, pelo escore 2 da área, onde visualizamos uma saburra cobrindo  $\frac{1}{3}$  do dorso lingual, sendo o terço posterior. Esse escore 2 pode ser considerado baixo, dentro da classificação que pode atingir até o escore 9, como máximo.

É interessante observar, apesar de não fazer parte da pesquisa, que ao ser questionada sobre possuir halitose, a paciente fonte respondeu



negativamente. Considerando o diagnóstico realizado de halitose real baseado no escore organoléptico 2 (da intimidade), e no valor de 120 ppb obtido com o monitor de sulfetos Halimeter®, o fato da paciente não sentir sua halitose pode ser explicado pelo fenômeno da adaptação olfatória, onde o epitélio olfatório submetido à exposição contínua de odores, deixa de percebê-los (PRINZ, 1930).

#### 5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELA TÉCNICA DO *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION*

Foi possível identificar a composição bacteriana a partir da amostra de saburra lingual, a qual teve resultado positivo para 100% das bactérias testadas pelas sondas de DNA do método *Checkerboard*, método este, que foi muito bem indicado neste estudo e preencheu ítems importantes como a rápida identificação e quantificação das espécies bacterianas presentes na amostra e principalmente a identificação das bactérias difíceis de serem cultivadas como as anaeróbias presentes na doença periodontal (LOESCHE et al., 1992). SAVITT et al. (1988) compararam os métodos de cultura e análise de sonda de DNA para detectar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em amostras de biofilme dental subgingival. As amostras foram coletadas de áreas gengivais de pacientes diagnosticados como saudáveis sistemicamente, com evidência de gengivite, periodontite agressiva ou periodontite crônica. O número desses patógenos foi determinado usando meios microbiológicos e testes bioquímicos. Os resultados foram então comparados aos números obtidos da análise de sonda de DNA espécie específica. Em sessenta amostras do grupo de doentes, análise de sonda de DNA demonstrou 100% de efetividade na detecção do *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*, além de 91% de efetividade na detecção de *P. gingivalis*. Os resultados sugerem que tecnologicamente a análise de sonda de DNA é superior ao método de cultura para a detecção do *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em biofilme subgingival de humanos. As sondas de oligonucleotídios sintéticos são as mais específicas e com menor reatividade cruzada pois são utilizados genes específicos às espécies bacterianas. É mais sensível, mais rápida e com menor custo se comparada à cultura (TSAI et al., 2003). Além disso após a coleta das amostras não é necessário ser processada imediatamente e não

precisa da viabilidade dos microrganismos (LOOMER, 2004). A técnica utilizada neste estudo foi descrita por SOCRANSKY et al. (1994) e utiliza sondas de DNA marcadas com a molécula não radioativa digoxigenina. (FERES e GONÇALVES, 2001; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1999; SOCRANSKY et al., 1994; FAVERI et al., 2006). As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a rápida identificação e quantificação de até 40 espécies bacterianas presentes nas amostras, a identificação de bactérias difíceis de serem cultivadas e o baixo custo.

Espécies periodontopatogênicas pertencentes aos diferentes complexos microbianos foram correlacionadas. Encontramos espécies predominantemente Gram-negativas anaeróbicas, resultado esperado, devido a paciente fonte ser portadora de doença periodontal. *V. parvula*, *T. forsythia* e *P. melaninogenica* foram detectadas em contagem absoluta acima de  $10^6$ , seguido por *P. nigrescens*, *F. periodonticum*, *N. mucosa* e *P. intermedia* com contagem absoluta a nível de  $10^6$ . *T. forsythia* é patógeno periodontal pertencente ao complexo vermelho, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, seu desenvolvimento em cultivo é fastidioso e está fortemente relacionado com periodontites severas. *V. parvula* é coco Gram-negativo, anaeróbio estrito, capaz de produzir ácido acético e ácido propiônico, aparentemente desprovida de patogenicidade, é espécie ubíqua e faz parte do complexo roxo. *P. melaninogenica* espécie formada por bacilos Gram-negativos, microrganismo anaeróbio estrito, isolado de bolsas periodontais ativas e canais radiculares, não entra na classificação dos complexos. *P. intermedia* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, espécie proteolítica e produtora de indol. Como existem evidências da sua participação na gengivite por alteração hormonal, na Ulcerativa Necrosante (GUN) e em bolsas periodontais que não apresentaram perda óssea recente, é um possível patógeno periodontal. Faz parte do complexo laranja a sua presença a nível de  $10^6$  é dado importante. *P. nigrescens* é espécie formada por bacilos Gram-negativos, anaeróbio estrito, pertence ao complexo laranja, sua participação na doença periodontal tem sido avaliada. *F. periodonticum* é bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, é proteolítico produtor de indol e faz parte do complexo laranja. *N. mucosa* é coco Gram-negativo, aeróbio e não pertencente aos complexos microbianos (De LORENZO e MAYER, 2004).

Alguns autores tem observado essas bactérias da cavidade oral e demonstrado sua capacidade em produzir compostos odoríferos. SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR (1979) encontraram entre outras espécies a presença do Gram-negativo *B. melaninogenicus*, hoje *P. melaninogenica* como produtor de CSV.

TONZETICH e McBRIDE (1981) afirmaram que *Bacteroides melaninogenicus* produz grandes quantidades de CSV. MINK et al. (1983) demonstraram que membros do gênero *Fusobacterium* e espiroquetas produzem níveis maiores de CSV do que outras bactérias não *Treponema* analisadas.

Sem especificar a espécie PERSSON, CLAEISSON e CARLSSON (1989) observaram que a microbiota subgengival é capaz de produzir CSV. PERSSON et al. (1990) destacaram como potentes produtores de compostos odoríferos *T. denticola* e *B. intermedius*, *Bacteroides loescheii*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* e *F. periodonticum*. Todas as 163 estirpes bacterianas do estudo puderam produzir um tipo de CSV, citando membros do gênero *Fusobacterium*, *Bacteroides* e *Veillonella*.

GREENMAN, SPENCER e MCKENZIE (2002) estudaram a produção de CSV (Halimeter®) a partir de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*. *P. intermedia* foi considerado ter uma baixa produção de CSV, se comparado com *F. nucleatum*.

SREENIVASAN em 2003 estudou as bactérias odorigênicas produtoras de sulfeto de hidrogênio, utilizando métodos bioquímicos. Identificaram membros dos gêneros: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Veillonella*.

McNAMARA, ALEXANDER, LEE (1972) não encontraram as bactérias em destaque na nossa amostra, mas confirmaram que a mudança de Gram-positivos para Gram-negativos foi acompanhada de odor pútrido. PIANOTTI, LACHETTE, DILLS (1986) em estudo *in vitro* afirmaram que *F. nucleatum* está envolvido na produção de compostos odoríferos, tanto CSV como COV. YOSHIMURA et al. (2000) afirmaram que *P. gingivalis* e *F. nucleatum* são bons produtores de CSV.

Da nossa amostra, com exceção de *T. forsythia* e *N. mucosa* as demais são reconhecidamente produtoras de CSV, segundo a revista de literatura (SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, 1979; TONZETICH e McBRIDE, 1981; PERSSON, CLAEISSON e CARLSSON, 1989; PERSSON et al., 1990; GREENMAN, SPENCER, MCKENZIE, 2002; SREENIVASAN, 2003; McNAMARA, ALEXANDER, LEE, 1972; PIANOTTI, LACHETTE e DILLS, 1986; YOSHIMURA et al., 2000).

Quando analisamos os trabalhos microbiológicos específicos de amostras do dorso de língua em pacientes com halitose encontramos que as bactérias prevalentes na nossa amostra foram encontradas por vários autores, como De BOEVER e LOESCHE que em 1995 trabalharam com 16 pessoas com queixa de halitose. Através do teste BANA e cultura microbiológica eles identificaram colônias representativas de bacteróides pigmentados de negro, como *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella intermedia*.

QUIRYNEN et al. (1999) estudaram a produção de CSV (Halimeter®) a partir de amostras da língua, tonsilas e faringe de 10 pacientes que procuraram tratamento de halitose. Incluíram avaliações dos CSV a partir de culturas puras das espécies *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*, por serem estas bactérias relacionadas com halitose na literatura. Os autores verificaram que houve produção dos CSV a partir das amostras clínicas (500 ppb) e das culturas puras (450 ppb) de forma muito similar.

ROLDÁN et al. (2003) coletaram amostras microbiológicas de placa subgingival, saburra lingual e saliva não estimulada de 40 pacientes com halitose. Identificaram *P. intermedia*, *T. forsythia*, *M. micros*, *C. rectus*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* baseado primariamente na morfologia da colônia e confirmado usando diferentes testes bioquímicos. Os autores observaram altas prevalências para *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* nas amostras de saburra lingual.

KAZOR et al. (2003) analisaram amostras do dorso lingual de 6 indivíduos saudáveis com queixa de halitose e 5 indivíduos controle, utilizando o teste BANA e técnicas moleculares. Identificaram nos indivíduos sem halitose: *S. salivarius*, *Rothia mucilaginosa* e uma espécie não identificada de

*Eubacterium*. Nos indivíduos com halitose: *Atopobium parvulum*, *Dialister* sp., *Solobacterium moorei*, *Eubacterium sulci*, *F. periodonticum*.

Em 2004, TANAKA et al. utilizaram PCR em tempo real para determinar a proporção dos patógenos periodontais anaeróbios *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola*. As amostras do material da língua foram coletadas de 29 indivíduos com halitose e 10 indivíduos sem halitose. Os resultados mostraram que somente *T. forsythia* teve altas proporções nos indivíduos com halitose quando comparado com indivíduos controle.

WASHIO et al. (2005) selecionaram 10 indivíduos com queixa de halitose e amostras da saburra lingual foram coletadas, sendo a microbiota produtora de sulfeto de hidrogênio identificada por métodos biológicos moleculares. O número de bactérias total e bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio no grupo com halitose foi significativamente maior do que no grupo sem halitose. Gêneros de *Veillonella*, *Actinomyces* e *Prevotella* foram os predominantes produtores de sulfeto de hidrogênio em ambos os grupos. Os autores concluíram que as bactérias periodontais produtoras de sulfeto de hidrogênio da saburra lingual parecem causar pouca halitose nos indivíduos sem a doença, sendo as bactérias principalmente espécies comensais da cavidade oral como do gênero *Veillonella* e *Actinomyces*.

No trabalho de KATO et al. (2005) os autores quantificaram os microrganismos *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* e *T. denticola* em amostras de saliva, saburra e placa subgingival de 22 pacientes de uma clínica de halitose, através da PCR Taq Man. Nas amostras de saburra e saliva encontraram porcentagens de pouca variação entre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. denticola*. E contrariamente à nossa amostra *T. forsythia* não foi detectada neste estudo.

O trabalho de DONALDSON et al. (2005) mostra um perfil microbiológico da halitose totalmente diferente do já referido até esse ponto. Vinte e um indivíduos com halitose e 20 indivíduos controle foram selecionados. Amostras do dorso lingual foram coletadas. Os anaeróbios estritos foram identificados pela sensibilidade ao metronidazol e as bactérias foram identificadas ao nível de Gênero por uma combinação de morfologia da colônia, coloração de Gram e testes bioquímicos e enzimáticos (rapid ID 32A).

Foi possível encontrar como predominantes no grupo teste e controle *Veillonella*, *Prevotella* e *Fusobacterium*. A maior diversidade de espécies foi encontrada no grupo halitose, se comparado com controle. Neste estudo não houve uma associação óbvia entre halitose e qualquer gênero específico bacteriano.

A partir do resultado da identificação microbiológica da nossa amostra de dorso lingual e a revisão de literatura correlata ficou muito claro afirmar que a microbiota Gram-negativa anaeróbica do dorso lingual desempenha um papel essencial na formação do mau odor bucal. Das 7 espécies prevalentes nesta investigação (*Veillonella parvula*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Neisseria mucosa* e *Prevotella intermedia*), apenas *N. mucosa* não foi relatada em nenhum estudo. As mais citadas na revista da literatura foram *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*. *T. forsythia* e os gêneros *Veillonella*, *Actinomyces* e *Prevotella* são citados também.

O trabalho de KAZOR et al. (2003) mostra espécies diferentes como *Atopobium parvulum*, *Dialister sp*, *Solobacterium moorei*, *Eubacterium sulci*.

DONALDSON et al. (2005), contrariando todos os trabalhos citados não relacionou nenhum tipo bacteriano com halitose e sugeriu que esta condição pode ser o resultado de interações complexas entre várias espécies bacterianas, inclusive as não cultiváveis.

Foi interessante o resultado do trabalho de FAVERI et al. (2006) que apesar de não estudarem pacientes com halitose encontraram as espécies *Prevotella melaninogenica* e *Veillonella parvula* prevalentes tanto no dia 0 quanto aos 10 dias do estudo (período sem higiene bucal e lingual) em 10 voluntários saudáveis. Amostra de saburra lingual foi coletada e a identificação microbiológica foi feita através do emprego da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Essas duas bactérias também estiveram prevalentes na nossa amostra.

Um dado importante dos resultados discutidos até esse ponto é sobre a saburra lingual. Vimos que a amostra estudada mostrou um pequeno escore de saburra visual quanto à espessura e área. Já a carga bacteriana dessa amostra foi considerada alta. Esse dado parece apontar para a importância da

composição da saburra e não somente para a quantidade dela. Quantos colegas ao visualizarem línguas com uma “inocente” camada de saburra fina não dão a devida importância e nem preocupam-se em investigar o motivo da formação dessa saburra e à sua eliminação. De BOEVER e LOESCHE (1995) associaram mau hálito com quantidade de saburra e com a carga bacteriana lingual. MORITA e WANG (2001) indicaram que a halitose estava associada com o volume da saburra lingual.

Além das 7 bactérias prevalentes encontradas na nossa amostra, houve a presença de uma alta porcentagem de células bacterianas relacionadas com doença periodontal, confirmando os dados da literatura de que a superfície lingual serve mesmo como um reservatório para os patógenos periodontais perpetuando um quadro de periodontia instalado (como é o caso da paciente selecionada) e podendo ser fator principal na recolonização das superfícies dentárias após a terapia periodontal (MAGER et al., 2003; VAN WINKELHOFF et al., 1986). A morfologia do dorso da língua com suas fissuras, ranhuras, papilas altas e áreas despiladas facilita, por si só, o acúmulo de microrganismos. Esses nichos anatômicos podem criar um ambiente onde microrganismos são bem protegidos da ação da limpeza salivar e onde os níveis de oxigênio são baixos, então promovendo o desenvolvimento da microbiota anaeróbica (ROLDAN, HERRERA, SANZ, 2003; DANSER, GOMEZ, VAN DER WEIJDEN, 2003).

## 5.2 CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

O interesse no estudo da superfície lingual tem aumentado nos últimos anos devido principalmente à sua associação com halitose (a grande área de superfície da língua com suas diferentes papilas, que retêm considerável quantidade de debris e possui uma grande concentração microbiana) e ainda, seu possível papel como reservatório para patógenos periodontais. A contagem das UFC a partir da solução mãe evidenciou uma concentração de  $2,07 \times 10^9$  UFC/mg de saburra lingual, que é um expressivo número de microrganismos, se comparado com a literatura. O que justifica a grande concentração de microrganismos na nossa amostra é o fato da paciente fonte ser portadora de doença periodontal (DREIZEN, GILLEY, SPIES, 1956;

YAEGAKI, SANADA, 1992). DE BOEVER, DE UZEDA e LOESCHE, 1995 encontraram a média de  $13,2 \times 10^6$  UFC/ml. DE BOEVER e LOESCHE, 1995 mostraram número  $9,4 \times 10^6$  UFC/ml e QUIRYNEN et al., 1998 evidenciou  $4,5 \times 10^7$  UFC/ml por amostra a partir do dorso lingual de pacientes com queixa de halitose.

### 5.3 CULTIVO BACTERIANO

A técnica do cultivo bacteriano diretamente nos frascos de vidro com tampa rosqueável submetidos à atmosfera de  $\text{CO}_2$  atendeu ao objetivo de proporcionar o crescimento das bactérias anaeróbias e ao mesmo tempo proporcionou condições de armazenar a fase aérea do meio de cultura para as análises posteriores com o sistema de Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas.

### 5.4 AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ODORÍFEROS – CG/EM

#### 5.4.1 Metodologia Utilizada

Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (CG/EM) foi a técnica utilizada para estudar a mistura dos compostos voláteis na fase aérea sobre o sistema do meio de cultura incubado nos frascos de vidro. Esta técnica é altamente sensível e reconhecida como o método de escolha para análises de misturas complexas (KOSTELC et al., 1980).

Alguns autores empregaram o sistema de CG isoladamente com detectores de Ionização de Chama-FID (MACKAY, LANG, BERDICK, 1959; LARSSON, 1965; SOLIS e VOLPE, 1973) ou com detectores de Chama Fotométrico-FPD (BRODY e CHANCY, 1966; RICHTER e TONZETICH, 1964; TONZETICH e KESTENBAUM, 1969; PERSSON, CLAESSON, CARLSSON, 1989; PERSSON et al., 1990; AWANO et al., 2002) ou os dois detectores no mesmo aparelho (TONZETICH, 1971; TONZETICH e CARPENTER, 1971; SOLIS-GAFFAR et al., 1975; SCHMIDT et al., 1978; SCHMIDT e TARBET, 1978; SCHMIDT e TARBET, 1979, SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, 1979 e SOLIS-GAFFAR, RUSTOGI e GAFFAR, 1980).

O sistema CG/EM já foi empregado para avaliar a fase aérea de sistemas salivares (KOSTELC et al., 1980) ou o ar bucal (PHILLIPS et al., 1999; PHILLIPS et al., 2005) ou ar bucal e alveolar (VELDE et al., 2007). É um



sistema que torna possível identificar além dos CSV também os COV e detectar causas extra-orais da halitose. As desvantagens seriam o substancial investimento e pessoal treinado para a condução da técnica (VELDE et al., 2007).

#### 5.4.2 Produção Total dos Compostos

A partir do cultivo bacteriano nos frascos de vidro foram gerados compostos voláteis que injetados no sistema de CG/EM puderam ser identificados. As FIGURAS 7 a 22 evidenciaram as curvas cromatográficas correspondentes aos diferentes compostos gerados. Foram 33 compostos identificados (TABELA 4). Destes selecionamos 14 compostos, que foram, como mostra a FIGURA 23, os mais frequentemente encontrados e mais expressivos em porcentagens.

#### 5.4.3 Papel dos Compostos Selecionados na Halitose

A TABELA 5 classifica os compostos encontrados segundo sua função química.

O isobutano é um hidrocarboneto – alcano e possui 4 carbonos na sua estrutura molecular. Não encontramos este composto nos trabalhos da revisão de literatura consultados. No entanto, autores como KOSTELC et al. (1980) encontraram essa classe de alcanos com 8 a 12 carbonos na fase aérea salivar de alguns indivíduos. PHILLIPS et al. (2005) também relataram a presença de alcanos, com número de carbonos entre 4 a 20, em análises do ar bucal de pacientes portadores de halitose. Dessa forma, o isobutano pode somar-se a outros compostos e assim colaborar para o quadro de halitose.

O ácido acético é um ácido carboxílico e já foi verificado no hálito de indivíduos normais segundo PHILLIPS et al. (1999). Não encontramos trabalhos que citam este composto na halitose.

O 2 buteno é um hidrocarboneto – alceno com 4 carbonos. Não foi encontrada referência a este composto na revisão dos trabalhos de literatura.

A metilmercaptana é um tiocomposto das funções nitrogenadas. A IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) abandonou o uso do termo “mercaptana” para essa classe de compostos (BARBOSA, 2004), dessa forma o correto seria a grafia metiltiol e não metilmercaptana. No entanto, ao

longo do texto, optamos por chamar o composto da forma tradicional e usado até hoje nos trabalhos científicos com odores bucais. É conhecida por ser um dos 3 principais compostos que geram a halitose (RICHTER e TONZETICH, 1964; TONZETICH e KESTENBAUM, 1969; TONZETICH, 1971; TONZETICH e CARPENTER, 1971; SOLIS-GAFFAR et al., 1975; SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, 1979; TONZETICH e McBRIDE, 1981; PIANOTTI, LACHETTE e DILLS, 1986; KRESPI et al., 2006) sendo extremamente fétida, com odor semelhante a “repolho podre” (VELDE et al., 2007). LEE, MAK e NEWSOME, 2004, revisando a literatura, concluem que o composto metilmercaptana é o mais odorífero dos CSV, com odor semelhante a fezes, e mostra correlação com taxas organolépticas.

O álcool isopropílico pertence às funções oxigenadas e não foi encontrada citação na revisão de literatura do envolvimento deste composto com halitose.

A ciclobutilamina é uma amina pertencente às funções oxigenadas. Não encontramos relatos na literatura com esta amina especificamente, mas existem vários trabalhos relacionando aminas, principalmente cadaverina e putrescina com halitose (PERSKY e BILLY, 1962; GOLDBERG et al., 1994; GOLDBERG, KOZLOVSKY e ROSENBERG, 2003; De BOEVER e LOESCHE, 1995; GREENSTEIN et al., 1997; PATOCKA e KUEHN, 2000; IWANICKA-GRZEGOREK et al., 2005).

A etilenimina também é uma amina das funções oxigenadas, e a exemplo da ciclobutilamina seu nome não foi encontrado na revista da literatura, mas sendo uma amina esse papel não deve ser descartado.

A O-metilhidroxilamina é outra amina das funções oxigenadas. Como para as aminas anteriores, não encontramos relatos na literatura citando especificamente esta amina com halitose, mas a gama de trabalhos envolvendo as aminas em geral com mau odor é clássica.

O composto dimetilsulfeto é um tiocomposto das funções nitrogenadas estando intimamente relacionado com halitose (TONZETICH, 1971; SOLIS-GAFFAR et al., 1975; SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, 1979; KRESPI et al., 2006). Sua ordem de envolvimento na halitose vem após a metilmercaptana, sendo o terceiro composto na lista de importantes geradores da halitose, cujo odor é descrito como “desagradavelmente doce”, encontrado

também no hálito de indivíduos saudáveis, mas é reconhecidamente componente da halitose (VELDE et al., 2007).

O 2-metil butano é um hidrocarboneto – alcano ramificado. Este mesmo composto foi encontrado em análises do ar bucal de indivíduos saudáveis por PHILLIPS et al. (1999).

A 2-butanona é uma cetona das funções oxigenadas. Este composto foi verificado, *in vivo*, recentemente em pesquisa com portadores de halitose (PHILLIPS et al., 2005) e em indivíduos sem halitose e cujo odor assemelha-se ao odor da acetona (VELDE et al., 2007).

O pentano é um hidrocarboneto – alcano. Este composto quando presente no hálito parece ser um marcador de aumento da atividade de stress oxidativo em numerosas doenças, como câncer, infarto agudo do miocárdio, esquizofrenia e artrite reumatóide e já foi identificado no hálito de pacientes saudáveis por PHILLIPS et al. (1999) e no hálito de portadores de halitose por PHILLIPS et al. (2005).

O dimetildissulfeto é um tiocomposto das funções nitrogenadas. Está relacionado com halitose (RICHTER e TONZETICH, 1964; TONZETICH e KESTENBAUM, 1969; TONZETICH e CARPENTER, 1971) em estudos, *in vitro*, com saliva. KOSTELC et al. (1980) encontraram esse composto em análises do ar bucal de indivíduos saudáveis sem doença periodontal. Este composto foi verificado, *in vivo*, recentemente por VELDE et al. (2007) no hálito de indivíduos saudáveis, apesar dos autores confirmarem que este composto faz parte da halitose com seu odor pungente.

O dimetiltrisulfeto é um tiocomposto das funções oxigenadas. Como o já referido e citado anteriormente dimetilsulfeto, esse composto também está intimamente ligado à halitose tendo sido encontrado por KOSTELC et al. (1980); KRESPI et al. (2006) e VELDE et al. (2007). Os últimos autores definem seu odor como pungente.

A elaboração da variedade de compostos supracitados no nosso trabalho corrobora os achados da literatura de que os CSV representam uma fonte importante na gênese da halitose, mas não são os únicos. Vários outros compostos, os COV, também odoríferos somam-se aos primeiros para compor o quadro de halitose. Esses dados são importantes e podem ser a resposta para uma dúvida clínica dos profissionais que tratam halitose. Como o caso

daqueles pacientes que relatam queixa de halitose e que ao se submeterem ao exame no monitor de sulfetos não há medida de odores, mas ao exame organoléptico existe a presença de odor. Provavelmente nestes casos existe a formação de COV e não CSV (ou pequena produção destes) e esse dado pode facilitar o diagnóstico e a condução mais apropriada de tratamento. De BOEVER e LOESCHE (1995) observaram que os escores BANA foram associados com taxas organolépticas da língua e do ar bucal, mas não com as medidas de CSV. Esses achados estão de acordo com relatos de KOZLOVSKY et al. (1994) que sugeriram que as bactérias BANA positivas podem ser responsáveis por ácidos graxos voláteis no hálito, além dos CSV. Embora os CSV sejam considerados os principais constituintes do mau hálito, o ar expirado pode conter esses ácidos graxos voláteis e outros gases, que comprometem o hálito e podem ser percebidos organolepticamente, mas não são identificados pelo monitor de sulfetos.

## 5.5 RELAÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS COM O SUBSTRATO

### 5.5.1 Produção do Dimetildisulfeto

Pelos resultados (GRÁFICO 1) verifica-se que o dimetildisulfeto foi o composto mais freqüente, pois foi produzido em 100% das amostras e no controle. Foi também o mais abundantemente produzido nas amostras. Este resultado está de acordo com os dados obtidos por TONZETICH e KESTENBAUM (1969) que avaliando os produtos voláteis produzidos a partir da placa dental de pacientes cultivada em saliva, em caldo nutriente (com 0,3% de caldo de carne) e em meio *trypticase-yeast extract basal medium* (TYE), verificaram que os compostos produzidos foram similares nos meios, sendo que o composto dominante foi o dimetildisulfeto.

Não houve interferência óbvia na produção deste composto com a adição dos substratos, desde que houve produção significativa no controle (onde não havia nenhum substrato, somente o meio de cultura). No frasco em que adicionamos o aminoácido L-lisina houve produção ligeiramente superior, mas não significativa, à verificada no controle, resultado esse, que pode ser explicado pelas variações inerentes à técnica cromatográfica, principalmente trabalhando em sistemas gasosos, como foi o nosso estudo. Era esperado que

os aminoácidos L-cistina, L-cisteína e L-metionina pudessem influenciar na produção deste composto, mas isso não foi verificado.

Foram correlatas as produções do dimetildissulfeto nos frascos L-cistina, L-cisteína, L-metionina, L-ornitina e L-arginina, com média de 73,84%. Com média acima visualizamos os frascos controle, L-lisina, L-triptofano, L-histidina e extrato de carne com média de 93,98% de produção do dimetildissulfeto. Uma explicação plausível para esse fato é que o dimetildissulfeto, sendo formado a partir de recursos sulfurados, tenha sido produzido pelo metabolismo bacteriano utilizando-se dos componentes do meio de cultura BHI, que é rico em precursores de enxofre (QUIRYNEN et al., 1999). Dessa forma o incremento do meio com substratos pode ter sido subaproveitado, devido à provável oferta nutricional encontrada no próprio meio.

Na literatura apenas TONZETICH e CARPENTER (1971) verificaram a produção deste composto com a adição de aminoácidos. Esses autores enriqueceram filtrado salivar esterilizado com os aminoácidos L-cistina, L-cisteína e L-metionina. Os sistemas enriquecidos com metionina obtiveram no total 8 picos no cromatógrafo, sendo evidente a presença de metilmercaptana e dimetildissulfeto.

#### 5.5.2 Produção dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

O GRÁFICO 2 mostra a produção de 4 CSV. Estes resultados evidenciam a riqueza em precursores de enxofre do meio BHI, pois no controle houve a produção de 3 dos 4 compostos visualizados, hipoteticamente os microrganismos utilizaram-se destes recursos para a produção dos citados 3 compostos. Isto sugere que o meio BHI poderia ser utilizado em investigações de halitose, para produção dos CSV.

A metilmercaptana foi produzida em porcentagens expressivas, mas não foi frequente (produzida em 2 de 9 amostras). Mostrou produção importante (22,56%) na amostra L-metionina. Esse resultado era esperado, pois a metilmercaptana é produzida por mecanismos de desulfuração enzimática bacteriana a partir da L-metionina (PIANOTTI, LACHETTE, DILLS, 1986). Esse dado do nosso experimento, confirma o papel do aminoácido L-metionina na produção da metilmercaptana. Numa análise bem criteriosa do

GRÁFICO 2 podemos afirmar que metilmercaptana juntamente com dimetildissulfeto e dimetiltrisulfeto corresponderam a mais de 99% dos compostos formados.

Na amostra L-lisina houve produção da metilmercaptana (1,43%), sem uma explicação aparente, sugerindo que este substrato pode ter exercido alguma ação sobre a produção da metilmercaptana, apesar de pequena e sem precedentes na literatura.

Os trabalhos de TONZETICH e RICHTER (1964) mostraram que a adição de L-metionina nos sistemas salivares incubados avaliados organolepticamente gerou odor com o passar do tempo.

Em 1971, TONZETICH e CARPENTER inocularam placa bacteriana em filtrado salivar esterilizado enriquecido com alguns aminoácidos. Nos sistemas com metionina foi evidente a produção de metilmercaptana.

Em 1979, SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR utilizaram o aminoácido L-cisteína para enriquecer sistemas salivares. Os autores confirmaram que este substrato é precursor do composto metilmercaptana.

Em 1986, PIANOTTI, LACHETTE e DILLS mostraram que a degradação da L-metionina leva à formação da metilmercaptana, através da incubação de amostras bacterianas ATCC de *F. nucleatum* enriquecidas com L-metionina. CLAEISSON et al. (1990) enriqueceram a solução salina testada com os aminoácidos L-cisteína e L-metionina para visualizar na cromatografia gasosa a produção de CSV a partir de 12 espécies do gênero *Fusobacterium*. Os autores verificaram que L-cisteína foi precursora de sulfeto de hidrogênio pela ação das 12 espécies. Sete espécies formaram metilmercaptana a partir de L-metionina. YOSHIMURA et al. (2000) mediram a formação de metilmercaptana a partir da degradação de L-metionina com algumas bactérias. *P. gingivalis*, *F. nucleatum* produziram metilmercaptana degradando L-metionina.

O dimetilsulfeto foi observado muito frequentemente entre as amostras (7 de 9 amostras). Não foi produzido nos frascos L-cistina e L-histidina. Pelos resultados sugere-se que extrato de carne, L-cisteína e L-ornitina influenciaram no aumento da produção observado nesses respectivos frascos. Era esperado que os dois primeiros substratos influenciassem a produção do composto, pois

contém precursores de enxofre. Já a influência da L-ornitina não era esperada e foi por razões desconhecidas. Não foi observada alteração na produção do dimetilsulfeto a partir dos substratos L-metionina, L-arginina, L-lisina e L-triptofano, pois as porcentagens verificadas nesses frascos foi menor do que a verificada no controle.

A literatura sobre o papel dos aminoácidos e formação do dimetilsulfeto mostram trabalhos como o de SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR (1979), que utilizando L-cisteína para enriquecer os sistemas salivares confirmaram que este substrato é precursor do dimetilsulfeto.

O dimetildisulfeto foi o composto mais freqüente e mais abundantemente produzido e por esse motivo, entendemos sua importância no experimento, já tendo sido discutido no item anterior (GRÁFICO 1).

O dimetiltrisulfeto foi freqüente entre as amostras (5 de 9 amostras), mas as produções foram inexpressíveis, correlacionando numericamente em todas as aparições, com 0,33% no controle; na L-cistina (0,18%), L-cisteína (0,31%), L-metionina (0,24%), L-arginina (0,41%) e L-lisina (0,36%). A ocorrência deste fato sugere que para a produção do composto dimetiltrisulfeto neste estudo, não houve a influência dos substratos adicionados aos frascos, pois a produção foi verificada no controle e nas amostras com porcentagens similares.

O composto sulfeto de hidrogênio é considerado por muitos autores, como o mais odorífero dos CSV e é o mais citado nos trabalhos (RICHTER e TONZETICH, 1964; TONZETICH e KESTENBAUM, 1969; TONZETICH e CARPENTER, 1971; TONZETICH, 1971; SOLIS e VOLPE, 1973; SOLIS-GAFFAR et al., 1975; BLANCHETTE e COOPER, 1976; SCHMIDT et al., 1978; SOLIS-GAFFAR, FISCHER e GAFFAR, 1979; SOLIS-GAFFAR, RUSTOGI e GAFFAR, 1980; PERSSON, CLAESSION e CARLSSON, 1989; PERSSON et al., 1990; WASHIO et al., 2005; KRESPI, SHRIME e KACHER, 2006; VELDE et al., 2007) e não foi detectado no experimento, apesar do sistema de CG/EM utilizado ter sido calibrado entre 10 e 350 m/z (sulfeto de hidrogênio tem 32 m/z). A primeira possibilidade é que realmente não tenha sido produzido pelo metabolismo bacteriano nas nossas amostras. A segunda possibilidade e a mais provável, é que foi produzido, mas não detectado, devido à sua enorme volatilidade que pode ter levado à sua remoção durante a dessorção térmica.

PHILLIPS et al. (2005) trabalhando com CG/EM relataram não conseguir detectar moléculas de baixo peso molecular, como o sulfeto de hidrogênio.

### 5.5.3 Produção dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV)

Os 10 COV selecionados no experimento são evidenciados no GRÁFICO 3.

O composto isobutano foi produzido em 2 amostras e no controle (não foi freqüente, mas foi produzido em porcentagens acima de 1%). Correlacionou quantitativamente no controle (1,01%) e no extrato de carne (1,15%) com porcentagens similares, sugerindo não haver associação entre a presença dos substratos e a produção do isobutano, ele seria como foi produzido, somente a partir da associação bacteriana e degradação do meio de cultura BHI. No entanto no frasco L-cisteína o isobutano representou 3,15% daquela amostra, sugerindo que o substrato adicionado influenciou na quantidade do composto produzido. O resultado sugere uma produção do isobutano independentemente da presença ou ausência dos substratos. Mas aponta para uma certa influência do aminoácido L-cisteína no aumento da produção do composto.

O ácido acético neste estudo obteve alta freqüência de produção entre as amostras, sendo 7 em 9 amostras. Nos frascos com os substratos L-cisteína, extrato de carne e no controle não houve a produção do composto, indicando certo papel de alguns substratos sobre a produção do ácido acético. Nos frascos L-lisina (0,21%) e L-metionina (0,17%) houve correlação das porcentagens diminutas produzidas. Na amostra L-histidina (0,50%), L-arginina (0,55%), L-triptofano (0,64%) e L-cistina (0,85%) também houve correlação com produção ligeiramente acima dos anteriores. Com uma produção de 2,41% a amostra L-ornitina foi a que obteve a maior produção deste composto, indicando ser este substrato o que mais influenciou a produção do ácido acético.

O 2-buteno foi considerado freqüente nas amostras estudadas (4 em 9 amostras). No entanto a produção quantitativa deste composto foi considerada inexpressiva. A produção no controle indica que nenhum substrato foi responsável pela presença deste composto. No controle observou-se produção de 0,35% do composto, 0,01% e 0,07% nas amostras L-metionina e L-lisina respectivamente. Este dado parece indicar que os substratos L-metionina e L-



lisina não influenciaram a produção do composto, pois os valores nestas amostras foram menores do que o produzido no controle. Juntamente com as amostras L-cistina, L-ornitina, L-arginina, L-triptofano e L-histidina onde não houve produção do composto. Quanto ao substrato L-cisteína parece ter influenciado no leve aumento de produção do composto naquela amostra (0,89%) e o extrato de carne parece ter sido o contribuidor para o aumento da produção observada naquela amostra, que foi a maior produção observada para este composto, com 1,20%.

O álcool isopropílico neste estudo foi produzido de forma modesta (1,64%) somente na amostra L-arginina, portanto não foi freqüente. Esse resultado parece indicar que o aminoácido L-arginina esteve envolvido de alguma forma na formação do composto.

A ciclobutilamina foi freqüente (6 em 9 amostras) e produzida também no controle. Esse dado indica que a presença desta amina no estudo não esteve vinculada aos incrementos com os substratos, pois foi produzida também no controle, e sim, que alguns substratos parecem facilitar o aumento da sua produção. Visualiza-se esse fato com a L-arginina, pois com seu incremento fez-se uma produção de 9,75% da ciclobutilamina. Menor incremento na produção foi observado com L-cisteína, extrato de carne e L-cistina. Pequena influencia parece ter sido exercida por L-triptofano. A produção da ciclobutilamina no frasco controle e L-histidina foi similar, indicando que este substrato não exerceu efeito sobre a produção da amina.

A etilenimina foi freqüentemente observada em 4 das 9 amostras. Como não foi produzida no controle podemos indicar que os substratos tiveram papel na presença deste composto. Pelos resultados sugere-se que sua maior produção ocorreu com o acréscimo do substrato L-ornitina. Produções modestas do composto foram visualizadas em ordem decrescente nas amostras L-cistina, L-triptofano. L-histidina também o fez, mas em porcentagens mínimas.

A O-metilhidroxilamina esteve presente em 5 de 9 amostras, tendo sido frequente e produzida em quantidades expressíveis. Não foi produzida no controle, dado que permite sugerir que a adição dos substratos foi necessária para a sua produção. Analisando os resultados sugere-se que os aminoácidos L-cistina seguido por L-ornitina exerceram um maior efeito sobre o aumento da

produção da O-metilhidroxilamina. L-arginina também parece ter desempenhado certo papel. L-triptofano juntamente com L-histidina parecem ter influenciado em pequeno acréscimo da produção da amina. A influencia na produção da amina principalmente pelos aminoácidos L-ornitina e L-arginina, era esperado (GOLDBERG, KOZLOVSKY e ROSENBERG, 2003; PATOCKA e KUEHN, 2000), apesar da literatura citar que estes aminoácidos podem formar a amina putrescina (GALE, 1946; HAYES e HIATT, 1974), acreditamos que possam explicar a geração da amina O-metilhidroxilamina. Já a produção devido à L-cistina não era esperado e não há uma explicação científica para o fato, pois este aminoácido é rico em enxofre, podendo justificar formação de CSV e não COV.

O 2-metil butano no nosso estudo foi freqüente (5 em 9 amostras), mas teve produção inexpressível. Não foi produzido no controle, indicando que sua presença pode ter sido devido aos incrementos com os substratos. A produção não passou dos 2,03% na amostra L-arginina, correlacionando com 1,19% da L-ornitina. Esse dado sugere que os aminoácido L-arginina e L-ornitina exerceram algum efeito para o aumento da produção do 2-metil butano. Menores efeitos parecem ter vindo com o acréscimo de L-cistina, L-triptofano e L-histidina.

A 2-butanona foi freqüente (4 de 9) e com a porcentagem verificada na amostra L-cisteína (8,60%) foi considerada produzida em valores expressíveis. A presença da 2-butanona não parece ser devido a nenhum dos substratos, pois foi produzida no controle. Os dados sugerem que alguns substratos tiveram efeito sobre o aumento da produção do composto, como ocorreu com o aminoácido L-cisteína. O extrato de carne também exerceu certa influencia sobre a produção do composto. L-metionina e L-lisina não desempenharam nenhum papel sobre a produção da 2-butanona.

O composto pentano foi muito freqüente entre as amostras (6 de 9 amostras). Os resultados mostram correlação entre as amostras L-ornitina e L-arginina com as maiores porcentagens produzidas do composto e é sugerido que esses substratos podem ter exercido alguma influência neste aumento de produção. L-cistina também parece ter o efeito de influenciar o aumento discreto do composto naquela amostras. Um aumento muito discreto na

produção do pentano foi observado com os substratos L-triptofano, L-histidina e extrato de carne e pode ser devido a esse incremento.

## 5.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES

Os dados da TABELA 6 evidenciam que pelo Halimeter® em todos os frascos de vidro avaliados houve a produção, embora variada, de CSV detectáveis por este método. Os escores organolépticos do método Vieira e Falcão também evidenciaram que os compostos produzidos são detectáveis pelo olfato humano e o fizeram de forma muito expressiva com o escore 4, que representa clinicamente halitose com grau de propagação acima de 50 cm. Isso significa que houve produção de compostos odoríferos.

Quando comparamos os valores entre os dois métodos (com base na TABELA 7), cinco frascos (L-cisteína, L-cistina, L-arginina, L-histidina e L-triptofano) mostraram valores que são clinicamente compatíveis. Já nos demais cinco frascos (L-metionina, L-lisina, L-ornitina, extrato de carne e controle) não houve correspondência das medidas entre os dois testes, sendo que os escores organolépticos foram sempre maiores. No frasco controle essa discrepância fica muito evidente, pois o valor de 100 ppb mostrado pelo Halimeter® não representa halitose e sim odor clinicamente natural, enquanto o escore 4 visualizado pelo organoléptico representa halitose com o maior grau de propagação deste método. Esse dado mostra como o olfato humano é ferramenta prontamente disponível, não onerosa e não restrita somente à detecção dos CSV abrangendo uma gama variada de diferentes moléculas odoríferas (GREENMAN et al., 2004). O monitor de sulfetos é útil clinicamente para medidas de halitose, mas detecta somente alguns CSV. Segundo ROSENBERG et al. (1991a) e ROSENBERG et al. (1991b) detecta sulfeto de hidrogênio, metilmercaptana e com menor sensibilidade o dimetilsulfeto. QUIRYNEN et al. (2003) sugerem que mede somente os dois primeiros compostos.

Estes dados nos permitem sugerir que o uso do Halimeter pode e deve ser utilizado clinicamente, mas sempre complementado pelo exame organoléptico. A avaliação organoléptica ainda é considerada a mais prática e confiável para uso clínico (SCHMIDT et al., 1978; MURATA et al., 2002). No entanto, um risco potencial da avaliação organoléptica, apontado por LEE,

MAK e NEWSOME (2004) é a possibilidade de se adquirir doenças pelo fluxo expiratório do paciente.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os resultados positivos da identificação para 40 espécies bacterianas, associado com a técnica da CG/EM confirmam a importância das bactérias Gram-negativas anaeróbicas na produção de compostos odoríferos;
2. *Veillonella parvula*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella melaninogenica* foram as espécies detectadas em maior número na amostra do dorso lingual, seguido por *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Neisseria mucosa* e *Prevotella intermedia*, microbiota Gram-negativa, predominantemente anaeróbica e facultativos;
3. O papel da língua como reservatório para patógenos periodontais foi confirmado, e enfatizamos a importância desse nicho como agente facilitador para o início e manutenção da doença periodontal, como também para a recolonização das áreas já tratadas;
4. O meio BHI mostrou-se excelente para a produção de compostos odoríferos, pois a partir dele 7 compostos foram produzidos a despeito da adição do substrato;
5. Houve a geração de mau odor em todos os frascos, com escores elevados principalmente ao método Organoléptico, o que confirma ser o olfato humano uma ferramenta útil e facilmente disponível para medidas clínicas de halitose;
6. Confirmou-se a produção da metilmercaptana a partir do aminoácido L-metionina. L-lisina parece ter tido alguma influência nesta produção.
7. A produção do dimetilsulfeto parece ter sido influenciada pelos substratos extrato de carne, L-cisteína e L-ornitina. Não foi verificado efeito de L-metionina, L-arginina, L-lisina e L-triptofano na produção deste composto.
8. O composto mais freqüente e mais abundante em todas as amostras do estudo foi o dimetildisulfeto. As maiores quantidades do mesmo foram produzidas no controle, L-lisina, L-triptofano, L-histidina e extrato de carne com média de 93,98% de produção. Não houve influência dos substratos adicionados ao meio para a produção deste composto.

9. A produção do composto dimetiltrisulfeto não sofreu a influência do incremento com substratos nos frascos estudados;
10. Não houve associação óbvia entre a presença dos substratos e a produção do composto isobutano, mas os resultados sugerem uma certa influência do substrato L-cisteína na quantidade produzida deste composto no frasco L-cisteína;
11. A produção do ácido acético parece ter sido influenciada principalmente pelo substrato L-ornitina. Certa influência deu-se também pelos substratos L-histidina, L-arginina, L-triptofano e L-cistina. Um menor papel parece ter sido desempenhado pelos substratos L-lisina e L-metionina. Nos frascos L-cisteína e extrato de carne não houve a produção do ácido acético.
12. A quantidade produzida do 2-butenos parece ter sido levemente influenciada pelo substrato L-cisteína naquela amostra. A maior produção observada para o 2-butenos parece ter sido facilitada pelo incremento com extrato de carne. Nas demais amostras os incrementos não parecem ter tido qualquer efeito sobre a presença e conseqüente produção do composto.
13. Os dados parecem indicar que o aminoácido L-arginina esteve envolvido na formação do composto álcool isopropílico.
14. A presença da ciclobutilamina no estudo não esteve vinculada aos incrementos com os substratos, mas houve certa ação desses sobre a porcentagem produzida. A L-arginina foi a que maior efeito exerceu na produção, seguida por L-cisteína, extrato de carne e L-cistina. Pequena influência parece ter sido exercida por L-triptofano. L-histidina parece não ter influenciado a produção da amina.
15. Sugere-se que a produção da etilenimina foi aumentada com o acréscimo do substrato L-ornitina. L-cistina e L-triptofano parecem ter exercido ligeiro aumento na produção da amina seguidos por L-histidina que o fez muito discretamente.
16. Sugere-se que L-cistina seguida por L-ornitina exerceram um maior efeito sobre a produção da O-metilhidroxilamina. L-arginina também parece ter desempenhado certo papel seguido por L-triptofano e L-histidina em menor grau de efeito.

17. L-arginina seguida por L-ornitina parecem ter algum efeito sobre o aumento da produção do 2-metil butano. Menores efeitos parecem ter vindo com os substratos L-cistina, L-triptofano e L-histidina.
18. Nenhum substrato foi o responsável pela presença da 2-butanona no estudo, mas sugere-se que a adição do aminoácido L-cisteína pode ter aumentado a produção do composto. O extrato de carne em menores proporções também o fez. L-metionina e L-lisina não desempenharam nenhum papel sobre a produção da 2-butanona.
19. L-ornitina e L-arginina podem ter exercido alguma influência no aumento de produção do composto pentano. Certa influência parece ter vindo do substrato L-cistina. Pequena influência pode ser devido ao incremento com os substratos L-triptofano, L-histidina e extrato de carne.

A partir de um paciente, que não foi o foco do trabalho, mas sim os microrganismos isolados da amostra do dorso lingual obtida deste paciente, amostra essa, significativa para a pesquisa, confirmou-se a importância da língua como reservatório para patógenos periodontais, serviu de alerta para a importância do Cirurgião-Dentista observar não somente a quantidade, mas também a composição da saburra lingual de seus pacientes, confirmou-se que esta saburra pode abrigar a microbiota responsável pela elaboração de compostos odoríferos, sugerindo que os CSV e os COV conjuntamente formam o quadro de halitose e que essa associação não pode ser desprezada ou mesmo ignorada. O número de trabalhos nessa área vem aumentando, mas ainda é pequeno, e esta pesquisa contribuiu para que futuras investigações ainda sejam realizadas.

**REFERÊNCIAS**

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immun**, v. 11, n. 4, p. 266-273, 1996.

AWANO, S.; GOHARA, K.; KURIHARA, E.; ANSAI, T.; TAKEHARA, T. The relationship between the presence of periodontopathogenic bacteria in saliva and halitosis. **Int Dent J**, v. 52, n. 3, p. 212-216, 2002.

BARBOSA, L. C. A. Álcoois. In: **Introdução à Química Orgânica**. São Paulo, Pearson Prentice Hall, 2004. p. 180.

BERG, M.; FOSDICK, L. S. Studies in periodontal disease II. Putrefactive organisms in the mouth. **J Dent Res**, v. 25, p. 73-81, 1946.

BERG, M.; BURRIL, D. Y.; FOSDICK, L. S. Chemical studies in periodontal disease III. Putrefaction of salivary proteins. **J Dent Res**, v. 25, p. 231-246, 1946.

BERG, M.; BURRIL, D. Y.; FOSDICK, L. S. Chemical studies in periodontal disease IV. Putrefaction rate as index of periodontal disease. **J Dent Res**, v. 26, p. 67-71, 1947.

BLANCHETTE, A. R.; COOPER, A. D. Determination of hydrogen sulfide and methyl Mercaptan in mouth air at the parts per billion by gas chromatography. **Anal Chem**, v. 48, n. 4, p. 729-731, 1976.

BOUTAGA, K.; VAN WINKELHOFF, A. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; SAVELKOUL, P. H. Comparison of real-time pcr and culture for detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 4950-4954, 2003.

BRENING, R. H.; SULSER, G.L.; FOSDICK, L.S. The determination of halitosis by use of the osmoscope and the cryoscopic method. **J Dent Res**, v.18, p. 127-132, 1939.

BRODY, S. S.; CHANCY, J. E. Flame photometric detector. The application of a specific detector for phosphorus and for sulphur compounds-sensitive to subnanogram quantities. **J Chromatogr**, v.4, p. 2-46, 1966.

CARLSSON, J.; LARSEN, J. T.; EDLUND, M. B. *Peptostreptococcus micros* has a uniquely high capacity to form hydrogen sulfide from glutathione. **Oral Microbiol Immun**, v. 8, p. 42-45, 1993.



CARY, J. E. The development of alkali within saliva and its relation to dental caries. **Aust J Dent**, v. 50, p. 4-9, 1946.

CLAESSON, R.; EDLUND, M. B.; PERSSON, S.; CARLSSON, J. Production of volatile sulphur compounds by various *Fusobacterium* species. **Oral Microbiol Immun**, v. 5, p. 137-142, 1990.

CHOI, B. K.; PARK, S. H.; YOO, Y. J.; CHOI, S. H.; CHAI, J. K.; CHO, K. S. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. **J Periodontol**, v. 9, p.1387-1394, 2000.

COVENTRY, J.; GRIFFITH, G.; SCULLY, C.; TONETTI, M. Halitosis. **BMJ**, v. 321, p. 36-39, 2000.

Consensus Report: Chronic Periodontitis. **Ann Periodontol**, v. 4, n.1, p. 38, 1999.

DANSER, M. M., GOMEZ, S. M., VAN DER WEIJDEN, G. A. Tongue coating and tongue brushing: a literature review. **Int J Dent Hyg**, v. 1, n. 3, p. 151-158, Aug. 2003.

DE BOEVER, E. H.; DE UZEDA, M.; LOESCHE, W. J. Role of tongue surface characteristics and tongue flora in halitosis. **J Dent Res**, v.74, AADR abstracts n. 923, p.127, 1995.

DE BOEVER, E. H.; LOESCHE, W. J. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. **JADA**, v. 126, p. 1384-1393, Oct. 1995.

DELANGHE, G.; BOLLEN, C.; DESLOOVERE, C. Halitosis-foetor ex oris. **Laryngo-Rhino otologie**, v. 78, p. 521-524, 1999.

DE LORENZO, J. L.; MAYER, M. P. A. Componentes bacterianos da microbiota bucal. In: DE LORENZO, J. L. **Microbiologia Para o Estudante de Odontologia**, 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 2004. p. 33-42.

DONALDSON, A.; MCKENZIE, A.; RIGGIO, M.; HODGE, P. J.; ROLPH, H.; FLANAGAN, A.; BAGG, J. Microbiological culture analysis of the tongue anaerobic microflora in subjects with and without halitosis. **Oral Dis**, v. 11, suppl. 1, p.61-3, 2005.

DREIZEN, S.; GILLEY, E. J.; SPIES, T. D. A comparison of the prevailing cell types in saliva of persons with and without periodontal disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 9, n.3, p. 278-283, 1956.

DZINK, J. L.; SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJJE, A. D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 15, p. 316-323, 1988.

FALCÃO, D. P.; VIEIRA, C. N. Halitose: Quais são os métodos de diagnóstico e tratamento da halitose? In: **Periodontia e Implantodontia. Desmistificando a Ciência**. Editora Artes Médicas, 2003. p. 359-375.

FAVERI, M.; FERES, M.; SHIBLI, J. A.; HAYACIBARA, R. F.; HAYACIBARA, M. M.; FIGUEIREDO, L. C. Microbiota of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. **J Periodontol**, v. 77, n. 9, p. 1539-1546, Sept. 2006.

FERES, M.; GONÇALVES, C. O impacto do diagnóstico microbiológico na terapêutica periodontal. In: OPPERMAN, R. V.; ROSING, C. K. **Periodontia: ciência e clínica**. 1ª ed. São Paulo, Artes Médicas, 2001. p. 39-56.

FERES, M.; FIGUEIREDO, L.; GONÇALVES, C. Diagnóstico periodontal por sondas de DNA. **Periodontia: A atuação clínica baseada em evidências científicas**. PAIVA, J. S.; ALMEIDA, R. V. (coordenadores). São Paulo, Artes Médicas, 2005. p. 85-106.

FOSDICK, L. S.; PIEZ, K. A. Chemical studies in periodontal disease X. Paper chromatography investigation of the putrefaction associated with periodontitis. **J Dent Res**, v. 32, p. 87-100, 1953.

GOLDBERG, S.; CARDASH, H.; BROWNING, H.; SAHLY, H.; ROSENBERG, M. Isolation of *Enterobacteriaceae* from the mouth and potential association with malodor. **J Dent Res**, v. 76, p. 1770-1775, 1997.

GOLDBERG, S.; KOZLOVSKY, A.; GORDON, D.; GELERNTER, I.; SINTOV, A.; ROSENBERG, M. Cadaverine as a putative component of oral malodor. **J Dent Res**, v. 73, n. 6, p. 1168-1172, 1994.

GALE, E. F. The bacterial amino acid decarboxylases. **Advan Enzym**, v. 6, p. 1-32, 1946.

GOLDBERG, S.; KOZLOVSKY, A.; ROSENBERG, M. Associação de Diaminas com mau hálito. In: ROSENBERG, M. **Halitose Perspectivas em pesquisa**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2003. p. 44-53.

GRAPP, G. L. Fetor Oris (Halitosis). **Northwest Med**, v. 32, p. 375-380, 1933.

GREENMAN, J.; SPENCER, P. S.; MCKENZIE, C. In vitro biofilm model to study hydrogen sulphide production. **J Dent Res**, v. 81, n. 2913, Spec Iss A-363, 2002.

GREENMAN, J.; DUFFIELD, J.; SPENCER, P.; ROSENBERG, M.; CORRY, D.; SAAD, S.; LENTON, P.; MAJERUS, G.; NACHNANI, S.; EL-MAAYTAH, M. Study on the organoleptic intensity scale for measuring oral malodor. **J Dent Res**, v. 83, n.1, p. 81-85, 2004.

GREENSTEIN, R. B. N.; GOLDBERG, S.; MARKU-COHEN, S.; STERER, N.; ROSENBERG, M. Reduction of Oral Malodor by oxidizing lozenges. **J Periodontol**, v. 68, p. 1176-1181, 1997.

GREENSTEIN, G. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. **J Periodontol**, v. 59, p. 508-14, 1988.

GROSSI, S.G. Ataque da placa dental: Conexão entre doença periodontal, doença cardíaca e diabetes melito. **Compendium**, v. 2, n. 1, Cap. 2, p. 15-24. Disponível em: <[www.usaway.net/homes/colgate/images/pdfsimposio/15-24.pdf](http://www.usaway.net/homes/colgate/images/pdfsimposio/15-24.pdf)> Acesso em: 16 abril 2007.

HAFFAJJE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; DIBART, S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. **J Clin Periodontol**, v. 19, p. 84-91, 1992.

HAYES, M. L.; HYATT, A. T. The decarboxylation of amino acids by bacteria derived from human dental plaque. **Archs Oral Biol**, v.19, p. 361-369, 1974.

IWANICKA-GRZEGOREK, K.; LIPKOWSKA, E.; KEPKA, J.; MICHALIK, J.; WIERZBICKA, M. Comparison of ninhydrin method of detecting amine compounds with other methods of halitosis detection. **Oral Dis**, v. 11, suppl. 1, p. 37-39, 2005.

KATO, H.; YOSHIDA, A.; AWANO, S.; ANSAI, T.; TAKEHARA, T. Quantitative detection of volatile sulfur compound-producing microorganisms in oral specimens using real time PCR. **Oral Dis**, v.11, suppl. 1, p. 67-71, 2005.

KAZOR, C. E.; MITCHELL, P. M.; LEE, A. M.; STOKES, L. N.; LOESCHE, W. J.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 558-563, Feb. 2003.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; Mc EWEN, C. N. **Gas chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide**. New York, Academic Press, 1996. 369 p.

KLEINBERG, I.; CODIPILLY, M. As bases biológicas para a formação do mau hálito. In: ROSENBERG, M. **Halitose Perspectivas em pesquisa**. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2003. p. 9-25.

KLEIN, M. I.; GONÇALVES, R. B. Detection of *Tannerella forsythensis* and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with periodontal status. **J Periodontol**, v. 74, n. 6, p. 798-802, June 2003.

KOSTELC, J. C.; PRETI, G.; ZELSON, P. R.; STOLLER, N. H.; TONZETICH, J. Salivary volatiles as indicators of periodontitis. **J Periodontol Res**, v.15, p. 185-192, 1980.

KOZLOVSKY, A.; GORDON, D.; GELERNTER, I.; LOESCHE, W. J.; ROSENBERG, M. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. **J Dent Res**, v. 73, n. 5, p. 1036-1042, 1994.

KRESPI, Y. P.; SHRIME, M. G.; KACKER, A. The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. **Otolaryn Head Neck Surg**, v. 135, p. 671-676, 2006.

LAMSTER, I. B.; CELENTI, R. S.; JANS, H. H.; FINE, J. B.; GRBIC, J. T. Current status of tests for periodontal disease. **Advan Dent Res**, v. 7, n. 2, p. 182-90, 1993.

LARSSON, B. T. Gas chromatography of organic volatiles in human breath and saliva. **Acta Chem Scand**, v. 19, p.159-164, 1965.

LAW, D. B.; BERG, M.; FOSDICK, L. S. Chemical studies on periodontal disease I. **J Dent Res**, v. 22, p. 373-379, 1943.

LEE, P. P. C.; MAK, W. Y.; NEWSOME, P. The aetiology and treatment of oral halitosis: an update. **Hong Kong Med J**, v.10, n. 6, p. 414-418, 2004.

LOESCHE, W. J.; BRETZ, W. A.; KERSCHENSTEINER, D.; STOLL, J.; SOCRANSKY, S. S.; HUJOEL, P.; LOPATIN, D. E. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine naphthylamide. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7 p. 1551-1559, 1990 a.

LOESCHE, W. J.; BRETZ, W. A.; LOPATIN, D. E.; STOLL, J.; RAU, C. F.; HILLENBURG, K. L.; KILLOY, W. J.; DRISKO, C. L.; WILLIAMS, R.; WEBER, H. P. Multicenter clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. **J Periodontol**, v. 61, n. 3, p. 189-196, 1990 b.

LOESCHE, W. J.; LOPATIN, D. E.; STOLL, J.; VAN POPERIN, N.; HUJOEL, P. P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? **J Clin Microbiol**, v.30, n. 2, p. 418-426, 1992.

LOESCHE, W. J.; KAZOR, C. Microbiology and treatment of halitosis. **Periodontology 2000**, v.28, p. 256-279, 2002.

LOESCHE, W. J.; De BOEVER, E. H. Estratégias para identificar os principais determinantes microbianos do mau hálito. In: ROSENBERG, M. **Halitose Perspectivas em Pesquisa**. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2003. p. 26-34.

LOOMER, P. M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal disease. **Periodontol** 2000, v. 34, p. 49-56, 2004.

LOTUFO, R. F. M.; PANNUTI, C. M.; SARAIVA, M. C. Bacteroides forsythus: sensibilidade a antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. **Pesqui Odontol Bras**, v. 1, p. 47-50, jan/mar, 2001.

MACKAY, D. A. M.; LANG, D. A.; BERDICK, M. The objective measurement of odour - III. Breath odour and deodourization. **Proc Sci Sect Toilet Goods Ass**, v. 32, p. 45-51, Dec. 1959.

MAGER, D. L.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J Clin Periodontol**, v. 30, N. 7, p. 644-654, 2003.

MASSLER, M.; EMSLIE, R. D.; BOLDEN, T. E. Fetor ex ore. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 4, p. 110-125, 1951.

Mc NAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**. John Wiley and Sons Inc, 1997. 193 p.

McNAMARA, T. F., ALEXANDER, J. F., LEE, M. The role of microorganisms in the production of oral malodor. **Oral Surg**, v. 34, n. 1, p. 41-48, July 1972.

MIHARA, J.; HOLT, S. C. Purification and characterization of fibroblast-activating factor isolated from *Porphyromonas gingivalis* W50. **Infect Immun**, v. 61, p. 588-95, 1993.

MINK, R. W.; BIEMER, T. A.; PIANOTTI, R. S.; DILLS, S. S. Volatile sulfur compound production in anaerobic oral bacteria. In: AADR, abstract 62, n. 91, 1983.

MIYAZAKI, H.; SAKAO, S.; KATOH, Y.; TAKEHARA, T. Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in general population. **J periodontol**, v. 66, p. 679-684, 1995.

MOMBELLI, A.; CASAGNI, F.; MADIANOS, P.N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 10-21, 2002.

MORRIS, P. P.; READ, R. R. Halitosis: Variations in mouth and total breath odor intensity resulting from prophylaxis and antisepsis. **J Dent Res**, v. 28, p. 324-333, 1949.

MORITA, M.; WANG, H. L. Relationship between sulcular sulfide level and oral malodor in subjects with periodontal disease. **J Periodontol**, v. 72, p. 79-84, 2001.

MURATA, T.; YAMAGA, T.; LIDA, T.; MIYAZAKI, H.; YAEGAKI, K. Classification and examination of halitosis. **Int Dent J**, v. 52, n. 3, p. 181-186, 2002.

NIST Mass Spectral Program, NIST/EPA/NIH - National Institute of Standard Tests / United States Environment Protection Agency / National Institute of Health. *Mass Spectral Library*, version 2.0 d, 2005.

NONNENMACHER, C.; MUTTERS, R.; de JACOBY, L. F. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, p. 213-217, 2001.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 2135-2146, 2006.

OHO, T.; YOSHIDA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; YAMASHITA, Y.; KOGA, T. Characteristics of patients complaining of halitosis and the usefulness of gas chromatography for diagnosing halitosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 91, n. 5, p. 531-534, 2001.

Parameters on Chronic Periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. **J Periodontol**, v. 71, p. 853-855, 2000a.

Parameters on Chronic Periodontitis with advanced loss of periodontal support. **J Periodontol**, v. 71, p. 856-858, 2000b.

PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol**, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PATOCKA, J.; KUEHN, G. D. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. **Acta Med**, v. 43, p. 119-124, 2000.

PERSSON, S.; CLAEISSON, R.; CARLSSON, J. The capacity of subgingival species to produce volatile sulfur compounds in human serum. **Oral Microbiol Immun**, v. 4, p. 169-172, 1989.

PERSSON, S.; EDLUND, M-B.; CLAEISSON, R.; CARLSSON, J. The formation of hydrogen sulfide and methylmercaptan by oral bacteria. **Oral Microbiol Immun**, v. 5, p. 195-201, 1990.

PERSKY, M. S.; BILLY, M. C. Recherches sus les odeurs dégagées par les anaérobies. **Ann Inst Pasteur**, v. 103, p. 461-464, 1962.

PHILLIPS, M.; HERRERA, J.; KRISHNAN, S.; ZAIN, M.; GREENBERG, J.; CATANEO, R. N. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. **J Chromat B**, v. 729, p. 75-88, 1999.

PHILLIPS, M.; CATANEO, R. N.; GREENBERG, J. MUNAWAR, M. I.; NACHNANI, S.; SAMTANI, S. Pilot study of a breath test for volatile organic compounds associated with oral malodor: evidence for the role of oxidative stress. **Oral Dis**, v. 11, suppl. 1, p. 32-34, 2005.

PIANOTTI, R.; LACHETTE, S.; DILLS, S. Desulfuration of cysteine and metionine by *Fusobacterium nucleatum*. **J Dent Res**, v. 65, n. 6, p. 913-917, 1986.

PIANOTTI, R.; PITTS, G. Effects of an Antiseptic Mouthwash on Odorigenic Microbes in the Human Gingival Crevice. **J Dent Res**, v. 57, n. 2, p. 175-179, Feb. 1978.

POLLACK, B. R. Determining mouth odors with the osmoscope. **Dent Progress**, v. 3, n. 3, p.59-63, Apr. 1963.

PRINZ, H. Offensive Breath, its causes and prevention. **Dent Cosmos**, v. 72, p. 700-707, 1930.

QUIRYNEN, M.; MONGARDINI, C.; VAN STEENBERGHE, D. The effect of a1-stage full-mouth disinfection on oral malodor and microbial colonization of the tongue in periodontitis patients. A pilot study. **J Periodontol**, v.69, p. 374-382, 1998.

QUIRYNEN, M.; VAN ELDERE, J.; PAUWELS, M.; BOLLEN, C. M. L.; VAN STEENBERGHE, D. In vitro volatile sulfur compound production of oral bacteria in different culture media. **Quintessence Int**, v. 30, p. 351-356, 1999.

QUIRYNEN, M.; ZHAO, H.; AVONTROODT, P.; SOERS, C.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; VAN STEENBERGHE, D. A salivary incubation teste for

evaluation of oral malodor: A pilot study. **J Periodontol**, v. 74, n. 7, p. 937-944, 2003.

RAMS, T. E.; FEIK, D.; SLOTS, J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. **Oral Microbiol Immun**, v. 8, p. 230-235, 1993.

RICHTER, V. J.; TONZETICH, J. The application of instrumental technique for the evaluation of odoriferous volatiles from saliva and breath. **Archs Oral Biol**, v. 9, p. 47-53, 1964.

RIVIERE, G. R.; ELLIOT, K. S.; ADAMS, D. F.; SIMONSON, L. G.; FORGAS, L. B.; NILIUS, A. M. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. **J Periodontol**, v. 63, p. 131-6, 1992.

ROLDÁN, S.; WINKEL, E. G.; HERRERA, D.; SANZ, M.; VAN WINKELHOFF, A. J. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 5, p. 427-434, May 2003.

ROLDÁN, S.; HERRERA, D.; SANZ, M. Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. **Clin Oral Invest**, v.7, p. 189-197, 2003.

ROSENBERG, M.; SEPTON, I.; ELI, I.; BAR-NESS, R.; GELERNTER, I.; BRENNER, S.; GABBAY, J. Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor. **J periodontol**, v. 62, n. 8, p. 487-489, 1991a.

ROSENBERG, M.; KULKARNI, G. V.; BOSY, A.; McCULLOCH, C. A. G. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulphide monitor. **J Dent Res**, v. 70, n. 11, p. 1436-1440, 1991 b.

ROSENBERG, M.; MC CULLOCH, C. A. G. Measurement of Oral Malodor: Current Methods and Future Prospects. **J. Periodontol**, v. 63, p. 776-782, 1992.

ROSENBERG, M. Introdução. In: ROSENBERG, M. **Halitose Perspectivas em pesquisa**. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2003. p.1-8.

SAKAMOTO, M.; SUZUKI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (TANNER et al.1986) as *Tannerella forsythensis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 841-849, 2002.

SANZ, M.; LAU, L.; HERRERA, D.; MORILLO, J. M.; SILVA, A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis



on advanced molecular techniques: a review. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 12, p. 1034-1047, Dec. 2004.

SAVITT, E. D.; STRZEMPKO, M. N.; VACCARO, K. K.; PEROS, W. J.; FRENCH, C. K. Comparison of cultural methods and dna probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. **J Periodontol**, v. 59, n. 7, p. 431-438, July, 1988.

SCHMIDT, N. F.; MISSAN, S. R.; TARBET, W. J.; COOPER, A. D. The correlation between organoleptic mouth-odor ratings and levels of volatile sulfur compounds. **Oral Surg**, v. 45, n. 4, p. 560-567, 1978.

SCHMIDT, N. F.; TARBET, W. J. The effect of oral rinses on organoleptic mouth odor ratings and levels of volatile sulfur compounds. **Oral Surg**, v. 45, n. 6, p. 876-883, 1978.

SHIMURA, M.; YASUNO, Y.; IWAKURA, M.; SHIMADA, Y.; SAKAI, S.; SUZUKI, K.; SAKAMOTO, S. A new monitor with a zinc-oxide thin film semiconductor sensor for the measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. **J. Periodontol**, v. 67, p. 396-402, 1996.

SHIMURA, M.; WATANABE, S.; IWAKURA, M.; OSHIKIRI, Y.; KUSUMOTO, M.; IKAWA, K.; SAKAMOTO, S. Correlation between measurements using a new halitosis monitor and organoleptic assessment. **J Periodontol**, v. 68, p.1182-1185, 1997.

SHIOTA, T.; KUNKEL, M. F. In vitro chemical and bacterial changes in saliva. **J Dent Res**, v. 37, p. 780-787, 1958.

SLOTS, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand J Dent Res**, v. 84, p. 1-10, 1976.

SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M. J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal dna amplification with the polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, v. 20, p. 304-307, 1995.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Anexo 1. In: SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. **Microbiologia Básica**, Fortaleza, Edições UFC, 1987. p.165.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJJE, A. D.; SMITH, G. L.; DZINK, J. L. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v.14, n. 10, p. 588-593, 1987.

SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-792, Oct. 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJJE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT Jr, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, p. 134-144, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T., LANG, N. P. **Tratado de Periodontia clínica e implantologia oral**. 3ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1999. p. 92-126.

SOLIS, M. C.; VOLPE, A. R. Determination of sulfur volatiles in putrefied saliva by a gas chromatography-microcoulometric titrating system. **J Periodontol**, v. 44, p. 775-778, 1973.

SOLIS-GAFFAR, M. C.; NILES, H. P.; RAINIERI, W. C.; KESTENBAUM, R. C. Instrumental evaluation of mouth odor in a human clinical study. **J Dent Res**, v. 54, n. 2, p. 351-357, Mar./Apr. 1975.

SOLIS-GAFFAR, M. C.; FISCHER, T. J.; GAFFAR, A. Instrumental evaluation of odor produced by specific oral microorganisms. **J Soc Cosmet Chem**, v. 30, p. 241-247, 1979.

SOLIS-GAFFAR, M. C.; RUSTOGI, K. N.; GAFFAR, A. Hydrogen sulfide production from gingival crevicular fluid. **J Periodontol**, v. 51, n. 10, 1980.

SPOUGE, J. D. Halitosis: A review of its causes and treatment. **Dent Pract Dent Records**, v. 14, p. 307-317, 1964.

SREENIVASAN, P. The effects of a triclosan/copolymer dentifrice on oral bacteria including those producing hydrogen sulfide. **Eur J Oral Sci**, v. 111, p. 223-227, 2003.

STEENBERGHE, D. V.; QUIRYNEN, M. Mau hálito. In: LINDHE, J.; KANUNG, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**, 4 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 495-501.

SULSER, G. F., LESNEY, T. A., FOSDICK, L. S. The reduction of breath and mouth odors by brushing the teeth. **J Dent Res**, v.19, p. 173-177, 1940.

SULSER, G. F.; BRENING, R. H.; FOSDICK, L. S. Some conditions that effect the odor concentration of breath. **J Dent Res**, v. 18, p. 355-359, 1939.

TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 72, p. 1354-63, 2001.

TAN, K. S.; SONG, K. P.; ONG, G. *Bacteroides forsythus* prH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. **J Periodontol Res**, v. 36, p. 398-403, 2001.

TANAKA, M. YAMAMOTO, Y.; KUBONIWA, M.; NONAKA, A.; NISHIDA, N.; MAEDA, K.; KATAOKA, K.; NAGATA, H.; SHIZUKUIISHI, S. Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. **Microb Infect**, v. 6, p.1078-1083, 2004.

TANNER, A. C.; HAFFER, C.; BRATTHALL, G. T.; VISCONTI, R. A.; SOCRANSKY, S. S. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. **J Clin Periodontol**, v. 6, p. 278-307, 1979.

TANNER, A. C.; DZINK, J. L.; EBERSOLE, J. L.; SOCRANSKY, S. S. *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis* and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. **J Periodontol Res**, v. 22, p. 327-330, 1987.

TARZIA, O. **Protocolo de atendimento clínico para prevenção, controle e tratamento da halitose**. Olinda Tarzia (org.) 1. ed., Editor HCL Representações e Comércio Ltda. São Paulo, Projeto Saubucal, 2000. 122 p.

TAUBMAN, M. A.; HAFFAJJE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, D. J.; EBERSOLE, J. L. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. **J Periodontol Res**, v. 27, p. 511-21, 1992.

TONZETICH, J.; McBRIDE, B. C. Characterization of volatile sulphur production by pathogenic and non-pathogenic strains of oral bacteroides. **Archs Oral Biol**, v. 26, p. 963-969, 1981.

TONZETICH, J.; RICHTER, V. J. **Int Ass Dent Res**, v.40, p. 44, Abstr, 1962.

TONZETICH, J.; RICHTER, V. J. Evaluation of volatile odoriferous components of saliva. **Archs Oral Biol**, v. 9, p. 39-45, 1964.

TONZETICH, J.; EIGEN, E.; KING, W. J.; WEISS, S. Volatility as a factor in the inability of certain amines and indole to increase the odour of saliva. **Archs Oral Biol**, v.12, p. 1167-1175, 1967.

TONZETICH, J.; KESTENBAUM, R. C. Odour production by human salivary fractions and plaque. **Archs Oral Biol**, v.14, p. 815-827, 1969.

TONZETICH, J.; CARPENTER, P. A. W. Production of volatile sulphur compounds from cysteine, cystine and methionine by human dental plaque. **Archs Oral Biol**, v. 16, p. 599-607, 1971.

TONZETICH, J. Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man. **Archs Oral Biol**, v. 16, p. 587-597, 1971.

TSAI, C. Y.; WOLFF, L. F.; GERMAINE, G.; HODGES, J. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. **J Clin Periodontol**, v. 30, p. 57-62, 2003.

U. S. EPA – United States Environmental Protection Agency. SW- Solid Waste 846 Test Methods for Evaluating Solid Waste. Physical/Chemical Methods. Method 8260 - Volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry, revisão 3, 1996.

VAN WINKELHOFF, A. J.; VAN DER VELDEN, U.; WINKEL, E. G.; de GRAAFF, J. Black-pigmented Bacteroides and motile organisms on oral mucosal surfaces in individuals with and without periodontal breakdown. **J Periodontol Res**, v. 21, n. 4, p. 434-439, 1986.

VAN WINKELHOFF, A. J.; LOSS, B. G.; VAN DER REIJEN, W. A.; VAN DER VELDEN, U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

VELDE, S. van den; QUIRYNEN, M.; HEE, P. van; STEENBERGHE, D. V. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 853, p. 54-61, 2007.

VIEIRA, C.; FALCÃO, D. Halitose: diretrizes para o diagnóstico e plano de tratamento. In: BRUNETTI, M. C.; FERNANDES, M. I.; MORAES, R. G. B. **Fundamentos da Periodontia – Teoria e Prática**. 1ª ed. São Paulo, Artes Médicas, 2007. p. 293-310.

WALKER, C. B.; GORDON, J. M.; MAGNUSSON, I.; CLARK, W. B. A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. **J Periodontol**, v. 64, p.772-781, 1993.

WASHIO, J.; SATO, T.; KOSEKI, T.; TAKAHASHI, N. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 889-895, 2005.

WATANABE, K.; FROMMEL, T. O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. **J Dent Res**, v. 72, n. 3, p. 1040-1044, 1993.

WILLS, C. L.; GIBSON, G. R.; HOLT, J.; ALLISON, C. Negative correlation between oral malodour and numbers and activities of sulphate-reducing bacteria in the human mouth. **Archs Oral Biol**, v. 44, p. 665-670, 1999.

WINKEL, E. G.; ROLDÁN, S.; VAN WINKELHOFF, A. J.; HERRERA, D.; SANZ, M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. A dual-center, double blind placebo-controlled study. **J Clin Periodontol**, v. 30, p. 300-306, 2003.

YAEGAKI, K.; SANADA, K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. **J Period Res**, v. 27, p. 233-238, 1992 a.

YAEGAKI, K.; SANADA, K. Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients. **J Periodontol**, v. 63, p. 783-789, 1992 b.

YAEGAKI, K.; COIL, J. M. Examination, classification and treatment of halitosis; clinical perspectives. **J Can Dent Assoc**, v.66, p. 257-261, 2000.

YOSHIMURA, M.; NAKANO, Y.; YAMASHITA, Y.; OHO, T.; SAITO, T.; KOGA, T. Formation of Methylmercaptan from L-methionine by *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6912-6916, 2000.

**ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

- a) Você, portador de doença periodontal, está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Caracterização de compostos odoríferos produzidos pela microbiota de dorso lingual e a relação com seu substrato nutricional”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
- b) O objetivo desta pesquisa é aumentar o entendimento, de forma científica do processo onde as bactérias que ficam alojadas na língua produzem gases que podem comprometer o hálito da pessoa.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que se submeta a uma única coleta de saburra da sua língua (que é aquele material mucoso amarelado ou esbranquiçado que deposita-se sobre sua língua e que deve ser removido durante a higiene bucal). Essa coleta será realizada raspando a superfície da sua língua com uma espátula de madeira polida e arredondada. Realizaremos um exame bucal, com material clínico (espelho e sondas) comuns aos consultórios odontológicos. E responda a um questionário sobre sua saúde geral e bucal. Não haverá nenhum desconforto nesses procedimentos.
- d) Não existem riscos que envolvem essa coleta da saburra lingual.
- e) Para tanto você deverá comparecer no laboratório de Microbiologia do Centro Positivo UnicenP, em Curitiba, para realizar esta única coleta. No caso de precisarmos repetir a amostra, você deverá comparecer mais uma vez no local indicado, mas será alertado previamente para isso.
- f) Contudo os benefícios esperados são: você terá direito ao diagnóstico do tipo de doença periodontal que possui e receberá instruções da correta forma de higiene bucal, incluindo a higiene de língua adequada.
- g) A pesquisadora Ana Cristina Zanchet Gomes, cirurgiã-dentista Periodontista (especialista em tratar gengiva e doenças periodontais), com telefones de contato: (41) 3242-6589 e (41) 9213-9313 e e-mail: oris-curitiba@halito.com.br que poderá ser contatada no endereço Rua Silveira Peixoto, número 1040, Conj. 905, Bairro Batel é a responsável pela coleta e poderá esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.
- h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos dentistas que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação,

isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.

- k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são da sua responsabilidade.
- l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Ana Cristina Zanchet Gomes  
Responsável pela pesquisa  
Local e data

## ANEXO 2:



CENTRO UNIVERSITÁRIO POSITIVO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3017-3290  
www.unicenp.edu.br  
e-mail CEPE: cep@unicenp.edu.br

\*Número do Protocolo:  
\_\_\_\_ 153 / 2007

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO  
PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO UNICENP**

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Caracterização de compostos odoríferos produzidos pela microbiota de dorso língua e a relação <i>in vitro</i> com seu substrato nutricional.
2. Aluno (s) envolvido(s): Ana Crissina Zanchet Gomes
3. Professor/Pesquisador Responsável: Dra. Cristina Leite Bastos Monteiro
4. Instituição do Professor/Pesquisador: UPPR/Unicamp
5. Local onde será realizada a Pesquisa: Unicenp

OBJETIVO
6. Cultivar a microbiota de dorso língua envolvida na produção de compostos odoríferos. Identificar as bactérias envolvidas nesta microbiota utilizando o sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massas.

SÍNTESE DO PROJETO
7. Este estudo tem como objetivo cultivar a microbiota de dorso língua envolvida na produção de compostos odoríferos em boca. Para tanto correrá a identificação das bactérias envolvidas na placa de saburra da microbiota utilizando o sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massas. Utilizar-se á pacientes portador de doença periodontal triado no curso de Especialização em Periodontia do centro universitário positivo. Este será submetido a um questionário de anamnese e uso de medicações e antisséptico bucais. A coleta será realizada através de raspagem com depressor de língua, em região de papila valada á borda lateral de língua. Após este momento será realizada a cultura bacteriana em diversos meios de cultura enriquecidos com aminácidos ( 1-cistina, 1 triptofano, 1 lisina, 1 ornitina, 1 arginina e 1 histidina).

COMENTÁRIOS DO RELATOR
8. Bom projeto, há apresentação do termo de consentimento esclarecido bem descrito, relatando e conscientizando possíveis aspectos benéficos, bem como os malefícios, ao paciente.

PARECER FINAL		
<input checked="" type="checkbox"/> Recomendada a aprovação	<input type="checkbox"/> Não recomendada a aprovação	<input type="checkbox"/> Em pendência
9. Recomendada a aprovação		

\* ITENS OBRIGATÓRIOS A SER PREENCHIDO

  
MARIA FERNANDA TORRES  
COORDENADORA





**ANEXO 3: ANAMNESE e EXAMES BUCAIS**

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Queixa principal: \_\_\_\_\_

Questionário:

Como está sua saúde? \_\_\_\_\_

Está em tratamento médico? \_\_\_\_\_

Uso de algum antibiótico nos últimos 3 meses? \_\_\_\_\_

Tem: ( ) Diabetes ( ) Anemia ( ) Hepatites ( ) Febre reumática

( ) problema renal ( ) problema cardíaco ( ) tuberculose

Você fuma? \_\_\_\_\_

Uso de algum antisséptico bucal no último mês? \_\_\_\_\_

Frequência do uso de escova dental: \_\_\_\_\_

Frequência do uso de fio dental: \_\_\_\_\_

Frequência do uso de limpador lingual: \_\_\_\_\_

Possui halitose?

**EXAME PERIODONTAL:**

1- Ausências dentárias:

2- Profundidade Clínica de Sondagem (Sonda Williams HU FRIEDY PQW)

3- Sangramento à sondagem:

- 1- Lesões de furca (Sonda de Nabers):
  
- 2- Mobilidade dental com 2 espelhos clínicos:

### HALITOMETRIA

CONSULTA	DATA	HORA	Halimeter Bucal	Halimeter Sistêmico	Organoléptico
INICIAL					

Valores referenciais das medidas do Halimeter e dos escores do teste organoléptico Vieira & Falcão.

Significado Clínico	Halimeter*	Vieira & Falcão
Ausência de halitose	< 80	0
Odor natural	80 - 100	1
Halitose da intimidade	100 - 120	2
Halitose do interlocutor	120 - 150	3
Halitose social	> 150	4

\* partes por bilhão (ppb)

## ANEXO 4: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA e SOLUÇÕES

### CALDO BHI (BRAIN HEART INFUSION)

#### INGREDIENTES:

Cloreto de Sódio.....	5g
Fosfato Bibásico de Sódio.....	2,5g
Infusão de Cérebro.....	12,5g
Infusão de Coração.....	5g
Peptona de Carne.....	10g
Dextrose.....	2g

pH final: 7,4 a 25°C

PREPARO: Dissolver 37 g do meio em um litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir 5 ml por tubo de 15x125mm. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Se não for usado no mesmo dia, armazenar entre 2 a 8°C. O meio preparado é válido por 6 meses.

FONTE: SOARES, CASIMIRO, ALBUQUERQUE (1987)

### SOLUÇÃO TE

#### INGREDIENTES:

Tris HCL (10mM).....	0,788gr
EDTA (1mM).....	0,186gr

PREPARO: Adicionar o pó a 500 ml de água destilada. Ajustar o pH para 7,6 e filtrar. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

FONTE: FERES, GONÇALVES (2005)

### NaOH:

PREPARO: Adicionar 1 g a 50 ml de água destilada.