DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus dois grandes amores, Pedro e Mauro, meu filho e meu marido.
Aos meus pais, Jandir e Nelsa, os primeiros e mais amorosos mestres.
À Mana e Renata, minhas irmãs e melhores amigas.

A certeza de sermos amados nos encoraja a irmos além, diminui nossas dificuldades e nos faz pessoas melhores.

AGRADECIMENTOS

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Jesus Cristo**, agradeço hoje e sempre, acima de tudo e todos.

À Prof. Dr^{a}. Cristina Leise Bastos Monteiro, da disciplina de Microbiologia Médica da UFPR, minha orientadora, sempre disponível e pronta. Agradeço pelas contribuições importantes nesse trabalho e pelo carinho constante comigo.

Ao Prof. Paulo Tomazinho, do laboratório de Microbiologia e Biotecnologia, do Curso de Odontologia, do Centro Universitário Positivo (UNICENP), meu co-orientador, pela dedicação indispensável na elaboração deste projeto e pelas sugestões sempre pertinentes que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

À Prof. Dr^{a}. Marília Compagnoni Martins, professora da disciplina de Periodontia da UFPR, exemplo de vocação ao ensino e à pesquisa, pelas dicas e presença insubstituível na evolução deste trabalho.

À Lílian Côcco, engenheira química pesquisadora do LACAUT- UFPR, outro exemplo de vocação ao ensino e à pesquisa, amiga de todas as horas, que esteve envolvida do início ao fim deste projeto e sem a qual este trabalho não teria sido concluído. Agradeço também ao Prof. Dr. Carlos Yamamoto, diretor do LACAUT por permitir a condução de parte do trabalho naquele laboratório.

Ao Natalício Ferreira Leite e Ronei Paixão, técnicos da Divisão de Análises e Ensaios Tecnológicos do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR que conduziram as avaliações cromatográficas, ítem decisivo neste trabalho. Agradeço imensamente ao TECPAR através do seu diretor técnico, Cézar Lenz, por ceder os ensaios para nosso experimento.

À Prof. Dr^{a}. Magda Feres, Coordenadora da Pós-Graduação e Pesquisa em Odontologia da UNG, por permitir de forma muito amável meu acesso aquela Instituição para realização da parte de identificação microbiana desta pesquisa.

À Izilvânia Barreto, técnica do laboratório de Microbiologia da UNG, que me ajudou na condução da técnica de identificação microbiana.

À Francielle Ramos, minha prestativa auxiliar, agradeço pelas digitações e por cuidar dos nossos pacientes, nas minhas ausências, com a sua cordialidade costumeira.

À Sirlei Aparecida França, minha secretária, por permitir a tranqüilidade necessária no momento da redação deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....vi
LISTA DE GRÁFICOS.....vii
LISTA DE FIGURAS.....viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....x
RESUMO.....xi
ABSTRACT.....xii
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Objetivos gerais.....3
1.2 Objetivos específicos.....3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....4
2.1 MICROBIOTA BUCAL E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS.....4
2.2 MICROBIOTA DA SABURRA E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS.....8
2.3 DOENÇA PERIODONTAL, INTERAÇÕES E COMPLEXOS MICROBIANOS.....14
2.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA.....18
2.5 COMPOSTOS ODORÍFEROS.....21
2.5.1 Métodos Para Avaliação dos Compostos Odoríferos.....21
2.5.2 Estudos Iniciais dos Compostos.....25
2.5.3 Compostos Sulfurados Voláteis (CSV).....28
2.5.4 Compostos Orgânicos Voláteis (COV) 35
2.6 IMPORTÂNCIA DOS AMINOÁCIDOS NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ODORÍFEROS.....40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....45
3.1 SELEÇÃO DO PACIENTE FONTE.....45
3.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SABURRA LINGUAL.....46
3.3 COLETA DA AMOSTRA CLÍNICA E CULTURA MICROBIANA.....46
3.3.1 Unidades Formadoras de Colônias.....47
3.3.2 Identificação Bacteriana.....47
3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....50

3.4.1 Instrumentos.....50

3.4.2 Avaliação dos compostos odoríferos.....51

3.4.3 Identificação e Quantificação dos Compostos Visualizados no cromatógrafo 54

3.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES.....54

3.5.1 Monitor Portátil de Sulfetos e Técnica Organoléptica.....54

4. RESULTADOS.....56

4.1 ÍNDICE DE SABURRA LINGUAL DO PACIENTE FONTE.....56

4.2 CONCENTRAÇÃO DAS UFC/ MG DA SABURRA LINGUAL 56

4.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....57

4.4 ANÁLISE NA CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....60

4.4.1 SELEÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS.....73

4.4.2 Produção do composto Dimetildisulfeto.....75

4.4.3 Produção dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV).....76

4.4.4 Produção de compostos Orgânicos Voláteis (COV).....77

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES.....78

5. DISCUSSÃO.....80

5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELA TÉCNICA DO *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION*.....81

5.2 CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.....87

5.3 CULTIVO BACTERIANO.....88

5.4 AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ODORÍFEROS–CG/EM.....88

5.4.1 Metodologia Utilizada.....88

5.4.2 Produção Total dos Compostos.....89

5.4.3 Papel dos Compostos Selecionados na Halitose.....89

5.5 RELAÇÃO DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS COM O SUBSTRATO.92

5.5.1 Produção do Dimetildisulfeto.....92

5.5.2 Produção dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV).....93

5.5.3 Produção dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV).....96

5.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ODORES.....99

6. CONCLUSÕES.....101

REFERÊNCIAS……..104
ANEXOS.....118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RELAÇÃO DAS CEPAS EMPREGADAS PARA A CONFECÇÃO DAS SONDAS DE DNA.....48

TABELA 2. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DA CG-EM PARA AS MEDIÇÕES DE COMPOSTOS ODORÍFEROS.....53

TABELA 3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DA AMOSTRA DO DORSO LINGUAL PELO MÉTODO *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION*.....58

TABELA 4. COMPOSTOS IDENTIFICADOS, COM OS RESPECTIVOS ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO.....72

TABELA 5. COMPOSTOS E SUA FUNÇÃO QUÍMICA.....74

TABELA 6. MEDIDAS DE CSV REALIZADAS PELO HALIMETER, EM PPB E ESCORES REGISTRADOS PELO TESTE ORGANOLÉPTICO VIEIRA e FALCÃO.....78

TABELA 7. SIGNIFICADO CLÍNICO E VALORES REFERENCIAIS DAS MEDIDAS DO HALIMETER E DOS ESCORES DO TESTE ORGANOLÉPTICO VIEIRA e FALCÃO.....79

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DO COMPOSTO DIMETILDISULFETO A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL.....75

GRÁFICO 2. PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DOS CSV A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL.....76

GRÁFICO 3. PORCENTAGENS DA PRODUÇÃO DOS COV A PARTIR DA AMOSTRA DA SABURRA LINGUAL.....77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPLEXOS MICROBIANOS NOS BIOFILMES SUBGENGIVAIS.....16

FIGURA 2. OSMOSCÓPIO.....22

FIGURA 3. HALIMETER.....24

FIGURA 4. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO MÉTODO *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION*.....49

FIGURA 5. SISTEMA DE CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS EMPREGADO.....51

FIGURA 6. CONTAGEM DAS UFC/MG DA SABURRA LINGUAL.....57

FIGURA 7. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO CONTROLE, SEM ADIÇÃO DE SUBSTRATOS, PARTE 1.....61

FIGURA 8. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO CONTROLE, SEM ADIÇÃO DE SUBSTRATOS, PARTE 2.....62

FIGURA 9. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTINA, PARTE 1.....63

FIGURA 10. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTINA, PARTE 2.....63

FIGURA 11. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA, PARTE 1.....64

FIGURA 12. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA, PARTE 2.....64

FIGURA 13. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-METIONINA, PARTE 1.....65

FIGURA 14. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-METIONINA, PARTE 2.....65

FIGURA 15. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ORNITINA.....66

FIGURA 16. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ARGININA, PARTE 1.....67

FIGURA 17. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-ARGININA, PARTE 2.....67
FIGURA 18. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-LISINA, PARTE 1.....68
FIGURA 19. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-LISINA, PARTE 2.....69
FIGURA 20. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-TRIPTOFANO.....70
FIGURA 21. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE L-HISTIDINA.....70
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DA FASE AÉREA DO FRASCO COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE CARNE.....71
FIGURA 23. COMPOSTOS MAIS FREQÜENTES E PRODUZIDOS EM MAIOR PORCENTAGEM NAS AMOSTRAS.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	= *American Type Culture Collection*
BANA	= *N-Benzoil-DL-arginine-2-naphthylamide;* reagente de N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
BHI	= *Brain Heart Infusion;* Infusão de cérebro e coração
CG/EM	= Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas
CSV	= Compostos Sulfurados Voláteis
COV	= Compostos Orgânicos Voláteis
cm	= Centímetro
cm^2	= Centímetro quadrado
cc	= Centímetro cúbico
DNA	= Ácido Desoxirribonucleico
et al.	= Abreviação de et alii (masculino plural), et aliae (feminino plural), ou et alia (plural neutro), que significa e outros (as)
eV.	= elétron-volt
EDTA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	= *Enzime-linked immunosorbent assay;*
FAA	= *Fastidious Anaerobe Agar*
FID	= *Flame Ionization Detector;* Detector de Ionização de Chama
FPD	= *Flame Photometric Detector;* Detector Fotométrico de Chama
g	= Grama
HCL	= Cloreto de Hidrogênio
HPLC	= *High Performance Liquid Chromatograph;* Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IUPAC	= União Internacional de Química Pura e Aplicada
in vitro	= Expressão latina que designa todos os fenômenos biológicos que tem lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado de um laboratório
m	= Metro
mL	= Mililitro
mm	= Milímetro
m/z	= Massa por Carga
NaOH	= Hidróxido de Sódio
PM	= Peso molecular
PCR	= Reação em cadeia da polimerase
ppb	= Partes por bilhão
TECPAR	= Instituto de Tecnologia do Paraná
TE	= Solução composta de Tris-HCL + EDTA
UNICENP	= Centro Universitário Positivo
UFPR	= Universidade Federal do Paraná
UNG	= Universidade de Guarulhos
UFC	= Unidade formadora de colônia
%	= Porcentagem
µg	= Micrograma
µL	= Microlitro
µm	= Micrômetro
°C	= Graus Celsius

RESUMO

Halitose é uma condição freqüente e motivo de procura ao Cirurgião-Dentista por parte da população, que sofre com o problema. O objetivo desta investigação *in vitro* foi estudar as bases biológicas da formação da halitose bucal, enfocando a tríade de fatores: bactérias bucais, substrato utilizado por elas e a conseqüente formação dos compostos odoríferos. Foi realizada coleta de uma amostra da saburra lingual, que é um material mucoso, de coloração variável, formado por células epiteliais descamadas, células sanguíneas, restos alimentares, bactérias entre outros, de 1 paciente portador de doença periodontal, utilizando um depressor de língua de madeira esterilizado, do terço posterior até o terço anterior lingual. A composição microbiana da amostra foi analisada através do método *checkerboard* DND-DNA *hybridization*. Parte da amostra foi diluída em caldo de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e agitada no vortex. A partir da suspensão bacteriana, frascos de vidro foram inoculados com os substratos L-cistina, L-cisteína, L-metionina, L-ornitina, L-arginina, L-lisina, L-triptofano, L-histidina e extrato de carne, incubados em condições anaeróbicas e os gases gerados na fase aérea dos frascos analisados pelo sistema de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG/EM). Das 40 espécies bacterianas detectadas, as encontradas com contagens maiores que 10^6 no dorso de língua foram *Veillonella parvula, Tannerella forsythia* e *Prevotella melaninogenica.* Com contagem de 10^6 encontramos *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium periodonticum, Neisseria mucosa* e *Prevotella intermedia*, o que sugere que a superfície da língua pode ser um importante reservatório para patógenos periodontais e pode desempenhar um papel na recolonização das superfícies dentárias e na etiologia da halitose. A contagem bacteriana em material coletado da superfície da língua foi de 2,07 x 10^9 UFC/mg da saburra. Quatorze compostos foram os mais freqüentes e produzidos em maior quantidade: isobutano, ácido acético, 2-buteno, metilmercaptana, álcool isopropílico, ciclobutilamina, etilenimina, dimetilsulfeto, O-metilhidroxilamina, 2 metil butano, 2-butanona, pentano, dimetildisulfeto e dimetiltrisulfeto. Dentre eles o predominante foi o dimetidisulfeto, que é um Composto Sulfurado Volátil (CSV) classicamente um representante odorífero. Dez dos compostos fazem parte dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV). O meio BHI mostrou-se excelente para estudos com odores, pois a partir dele 7 compostos foram produzidos a despeito da adição do substrato. O aminoácido L-metionina destacou-se na geração de odor, confirmando sua influência na produção do composto metilmercaptana. O sistema CG/EM mostrou ser eficaz na detecção e identificação dos compostos gasosos da mistura aérea incubada.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias bucais, aminoácidos, compostos odoríferos, cromatografia gasosa/espectrometria de massas

ABSTRACT

Halitosis is a frequent condition and reason of search to the dentist for part of the population, that suffers with the problem. The objective of this investigation in vitro was to study the biological bases of the formation of oral halitosis, focusing the triad of factors: oral bacteria, substratum used for them and the consequent formation of odorous compounds. A sample was taken of the tongue coating that is a mucous material, of variable color, comprised of desquamated epithelial cells, blood cells, alimentary remaining portions and bacteria, of one periodontal patient, using a sterile wooden tongue depressor, from the vallate papilla area to the anterior tongue border. The microbial composition of the sample was analyzed through the Checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Part of the sample was diluted in broth of culture Brain Heart Infusion (BHI) and agitated in the Vortex. From the bacterial suspension, glass vials had been inoculated with the aminoacids L-cystine, L-cysteine, L-methionine, L-ornithine, L-arginine, L-lysine, L-tryptofhane, L-histidine and meat extract, incubated in anaerobic conditions and the vapour above the bacterial suspensions analyzed for Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS). Of the 40 detected bacterial species, Veillonella parvula, Tannerella forsythia and Prevotella melaninogenica were found in highest counts of 10^6. Prevotella nigrescens, Fusobacterium periodonticum, Neisseria mucous and Prevotella intermedia were found in counts of 10^6. The tongue surface could be an important reservoir for periodontal pathogens and may play a role in the recolonization of tooth surfaces and in the etiology of oral halitosis. CFU was of 2,07 x 10^9 CFU/mg tongue coating. Fourteen compounds were the more frequent and had been produced in bigger amount: isobutane, acid acetic, 2-butene, methylmercaptane, isopropilic alcohol, ciclobutilamine, etilenimine, dimethylsulfide, O-metilhidroxilamine, 2 metil butane, 2-butanone, pentane, dimethyldisulfide and dimethyltrisulfide. Dimethyldisulfide was the predominant compound. It is a malodour component Volatile Sulfur Compound (CSV). Ten compounds are part of Volatile Organic Compound (COV). From the broth BHI 7 compounds had been produced, it is excellent results for studies with odors. Was confirmed the influence of L-methyonine in the production of the methylmercaptane. GC/SM showed to be efficient in the detection and identification of gaseous compounds above the bacterial suspensions.

KEY WORDS: oral bacterial, aminoacids, odours compounds, gas chromatography and mass spectrometry