

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE BELMONTE ARCHETTI

INTERFERÊNCIA DOS SUCOS DE UVA INTEGRAL E RECONSTITUÍDO NA  
ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS SALIVARES E DA PELÍCULA DENTAL  
ADQUIRIDA DO ESMALTE

CURITIBA

2014

FELIPE BELMONTE ARCHETTI

INTERFERÊNCIA DOS SUCOS DE UVA INTEGRAL E RECONSTITUÍDO NA  
ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS SALIVARES E DA PELÍCULA DENTAL  
ADQUIRIDA DO ESMALTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Machado Benelli

CURITIBA

2014

**TERMO DE APROVAÇÃO**

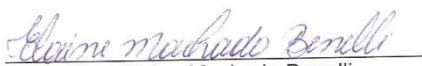
FELIPE BELMONTE ARCHETTI

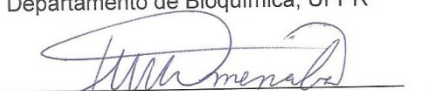
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

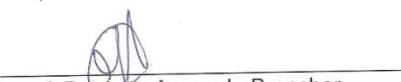
INTERFERÊNCIA DOS SUCOS DE UVA INTEGRAL E RECONSTITUÍDO NA  
ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS SALIVARES E DA PELÍCULA DENTAL  
ADQUIRIDA DO ESMALTE

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elaine Machado Benelli  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes  
Departamento de Estomatologia, UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Armando Brancher  
Departamento de Bioquímica - PUCPR

Curitiba, 12 de março de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha família, pelo apoio e paciência.

Aos meus amigos, em especial, Lucas Saling, Filipe Leiria , Fávero Santos, Diogo Manassés, Markus Fendel, Guilherme Balvedi e Patrícia Takemasa, pela paciência, incentivo, ajudas nos tratamentos de dados e pelas doações de saliva.

Ao colega Juliano Morimoto Borges, da Universidade Federal do Paraná, hoje Doutorando na Oxford University na Inglaterra, pelo grande auxílio no laboratório.

Aos colegas da turma 2013-2015 do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná pelas doações de saliva.

Ao Pós-Doutorando do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, Diego Correia, pela ajuda no laboratório.

À minha orientadora, Prof. Dra. Elaine Machado Benelli, pelo aprendizado e pela paciência.

À colega do mestrado Luciana Lyra, por emprestar o consultório para que eu pudesse preparar os dentes bovinos.

Ao Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes, pelo incentivo.

À Prof. Dra. Marília Compagnoni Martins, com quem cumpri boa parte do estágio em docência.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Valter e Rose.

Ao doutorando do Departamento de química e técnico do laboratório de infravermelho, Tiago Hommerding Pedrozo.

Aos pós-graduandos em Ciências – Bioquímica do laboratório de Oxidações Biológicas e dos laboratórios de Carboidratos pela ajuda no laboratório.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, que me recebeu de portas abertas em seus laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“The professional man has no right to be other, than a continuous student”

(Greene Vardiman Black)

## RESUMO

A saliva é um fluido da cavidade oral composta por íons e macromoléculas como proteínas e glicoproteínas, entre outras. A adsorção das proteínas da saliva sobre a superfície eletronegativa da hidroxiapatita conduz a formação da película adquirida que protege a estrutura dental de componentes ácidos da dieta. Este trabalho visa avaliar o efeito do suco de uva na estrutura das proteínas salivares e composição da película dental adquirida do esmalte. A saliva estimulada foi coletada e misturada *in vitro* com amostras de suco de uva integral e suco de uva reconstituído em diferentes proporções. O pH e a acidez titulável de cada condição foi medido e alterações no perfil do espectro sincronizado de fluorescência e o espectro de emissão (excitação a 282 nm) foram monitorados em de 300 a 800 nm. Alterações na composição de proteínas salivares nas diferentes condições também foram analisadas em eletroforese de SDS-PAGE. A película dental adquirida do esmalte foi formada *in vitro* sobre blocos de esmalte bovino e a composição desta película analisada por ATR-FTIR. Os resultados mostram quanto maior a proporção suco/saliva menor o pH das amostras. Um deslocamento do espectro sincronizado das proteínas salivares para comprimentos de ondas elevados ocorre proporcionalmente a quantidade de suco adicionada as amostras, concomitante as alterações do perfil proteico das amostras de suco:saliva. Os espectros de emissão (excitação a 282 nm) mostram que com a adição de pequenas quantidades de sucos o pico em 280 nm desaparece. As análises de ATR das películas dentais adquiridas do esmalte formadas em presença das misturas de suco: saliva mostram que componentes dos sucos, provavelmente os polifenóis, adsorvem a superfície do esmalte. Os resultados sugerem que a adição de sucos gera alterações conformacionais das proteínas que levam a precipitação e alteração da composição proteica da saliva e os polifenóis dos sucos parecem adsorver a hidroxiapatita.

Palavras-Chave: Polifenóis; *Vitis*, Sucos; Saliva; Proteínas e Peptídeos Salivares.

## ABSTRACT

Saliva is a fluid from oral cavity composed of ions and macromolecules such as proteins and glycoproteins, and others. Adsorption of salivary proteins on the electronegative surface of hydroxyapatite leads to the formation of this pellicle that protects teeth from diet components. This study aims to assess the effect of grape juice on salivary proteins structure and in the composition of the enamel acquired pellicle. Stimulated saliva was collected and mixed with *in vitro* samples of whole grape juice and reconstituted grape juice in different proportions. Titratable acidity and pH of each condition was measured and changes in fluorescence synchronized spectrum and the emission spectrum (excitation at 282 nm) were monitored from 300 to 800 nm. Changes in the composition of salivary proteins in the different conditions were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. The enamel acquired pellicle was formed *in vitro* onto bovine enamel blocks and the composition of this pellicle was analyzed by ATR-FTIR spectra. Results showed that at higher juice:saliva proportion, lower is the pH of the sample. Besides, a shift of the spectrum of synchronized salivary proteins to high wave lengths proportionally the amount of juice added, along with changes in protein profile of juice:saliva samples occurs. The emission spectrum (excitation at 282 nm) showed that small amounts of juice made the 280 nm peak disappear. The ATR measures of the enamel acquired pellicle formed in the presence of juice:saliva mixtures, showed that juice components, probably the polyphenol adsorbed to the enamel. Results suggested that the juices leads to conformational changes of salivary proteins that cause protein precipitation, changing protein salivary composition and the juice polyphenols seems to adsorb onto hydroxyapatite.

Keywords: Polyphenols; *Vitis*; Juices; Saliva; Salivary Proteins and Peptides.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 SALIVA.....	15
3.1.1 Composição.....	15
3.1.2 Funções da Saliva.....	17
3.2 PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA DO ESMALTE.....	19
3.2.1 Composição da película dental adquirida do esmalte (PDAE).....	19
3.2.2 Formação da película dental adquirida do esmalte.....	22
3.2.3 Relação entre proteínas da saliva e proteínas da PDAE.....	23
3.2.4 Funções da película dental adquirida do esmalte.....	24
3.2.5 Interferência da dieta na formação da PDAE.....	25
3.2.6 Polifenóis.....	31
3.2.7 Composição da uva.....	33
3.2.8 Ácidos em alimentos e bebidas.....	35
4 Material e Métodos.....	37
4.1 Aspectos Éticos.....	37
4.1.1 Consentimento livre e esclarecido.....	37
4.1.2 Voluntários.....	37
4.2 Coleta de saliva.....	37
4.3 Seleção de bebidas.....	38
4.4 Avaliação de parâmetros salivares durante a exposição aos sucos.....	39
4.4.1 Determinação do pH das misturas suco: saliva.....	39
4.4.2 Curva de titulação dos sucos e das misturas suco: saliva.....	40
4.4.3 Efeito da solução suco: saliva sobre a estrutura das proteínas salivares.....	40
4.4.4 Determinação do perfil de proteínas solúveis das amostras suco: saliva.....	41
4.5 Avaliação do efeito dos sucos na formação da película dental adquirida do esmalte <i>in vitro</i> .....	41
4.5.1 Formação <i>in vitro</i> da película dental adquirida do esmalte.....	41
4.5.2 Extração da película dental adquirida.....	42
4.5.3 Análise espectroscópica das proteínas formadas <i>in vitro</i> por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier/ Reflectância Total Atenuada (FT-IR/ATR).....	42
5 RESULTADOS.....	44
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	68



## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

TABELA 1 – Componentes da saliva e suas respectivas funções

TABELA 2 – Principais proteínas da PDAE e suas funções

QUADRO 1 – Resumo dos estudos de interferência de componentes da dieta na PDAE

TABELA 3 – Variação do pH das misturas suco: saliva

TABELA 4 – Capacidade de tamponamento das misturas saliva: suco

QUADRO 2 – Relação pH / volume de saliva e volume de bebida adicionado

## **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Classificação dos polifenóis

FIGURA 2 – Sequência dos experimentos realizados

FIGURA 3 – Curva de titulação das bebidas

FIGURA 4 – Espectros de emissão de fluorescência

FIGURA 5 – Perfil das proteínas solúveis das misturas bebida: saliva em diferentes proporções

FIGURA 6 – Espectros de ATR das amostras

FIGURA 7 – Espectros de ATR das amostras

FIGURA 8 – Espectro de fluorescência sincronizado das amostras

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dental e a erosão são doenças dos tecidos dentais duros relacionadas aos hábitos dietéticos dos indivíduos. Quando os indivíduos aumentam a ingestão de carboidratos fermentáveis, as bactérias do biofilme metabolizam estes carboidratos à ácidos que reduzem o pH no biofilme e provocam desmineralização dental. Nos estágios iniciais esta desmineralização é subsuperficial, mas com o avanço da doença a superfície do esmalte é comprometida. Já a erosão é uma desmineralização causada por ácidos de origem não bacteriana, em geral ácidos provenientes da dieta do indivíduo. Neste caso a desmineralização ocorre na superfície do esmalte (AL MAJED *et al.*, 2002; HARA; ZERO, 2010; LUSI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

A saliva humana que banha os tecidos bucais apresenta propriedades protetoras contra cárie e erosão. A saliva é produto das glândulas salivares maiores e menores, do fluido gengival e da cavidade nasal. Ela é composta por íons, como: bicarbonato, fosfato, cálcio e flúor e proteínas, glicoproteínas, peptídeos e enzimas (SCHENKELS *et al.*, 1995; NIEW AMERONGEN *et al.*, 2004). Algumas macromoléculas salivares, principalmente as proteínas adsorvem seletivamente às superfícies dentais logo após a higienização, formando a película dental adquirida (revisado por HARA e ZERO, 2010; WADE, 2010). Esta película possui importantes funções de barreira, protegendo as superfícies bucais de desidratação, desmineralização, além de servir de âncora para adesão de microrganismos e formação do biofilme (RUPP, 2012).

Os componentes da dieta influenciam na composição e formação da película dental adquirida do esmalte (PDAE). Os efeitos de sucos de fruta, ácido cítrico e bebidas gaseificadas na película dental adquirida foram estudados por AMAECHI *et al.*, (1999); HANNIG; BALZ, (1999); FINKE *et al.*, (2002); HANNIG *et al.*, (2003); HANNIG *et al.*, (2004); HARA *et al.*, (2006); HANNIG *et al.*, (2009). O efeito de proteínas do leite humano e bovino, iogurte e de bebidas probióticas sobre a PDAE também já foi avaliado (VACCA-SMITH; BOWEN, 1994; VACCA-SMITH; BOWEN, 2000; DEVOLD *et al.*, 2006;

WERNERSSON *et al.*, 2006; HAUKIOJA *et al.*, 2008). TEIXEIRA *et al.*, (2006; 2007) mostram a influência das lectinas na formação da película. O efeito dos óleos comestíveis foi descrito por HANNIG *et al.*, (2012; 2013) e YAO *et al.* (2012) estudaram a influência da fruta tropical *Carica papaya* sobre a PDAE. Vários autores mostraram a influência de bebidas polifenólicas, como: chás e vinho na formação e composição da PDAE (JOINER *et al.*, 2003; JOINER *et al.*, 2004; PROCTOR *et al.*, 2005; JOINER *et al.*, 2006; KHAN; MUKHTAR, 2007; HANNIG *et al.*, 2008)

Os sucos de uva, que são ricos em polifenóis e juntamente com outros derivados de uva, excluindo o vinho, tiveram sua produção e consumo triplicado, de 2004 para 2011 (IBRAVIN/SEAPA/MAPA – RS, 2011, LAGO-VANZELA *et al.*, 2011). De acordo com dados oficiais da SisDeclara (Sistema Integrado de declarações das Vinícolas) o consumo de suco de uva integral registrou um aumento médio de 400% de 2008 a 2013. O aumento no consumo do suco de uva integral, pode ser atribuído à inclusão da bebida no cardápio da merenda escolar na rede de ensino, pela aprovação do projeto de Lei N<sup>o</sup> 13.247/2009, pela assembleia legislativa do Rio Grande do Sul e sanção da medida pelo governo do estado. O consumo de sucos de frutas industrializados com adoçantes é maior do que o consumo de suco de frutas 100% naturais, sem aditivos (PAPANDREOU *et al.*, 2013), e esse consumo pode ser fator de risco para erosão dentária (OKUNSERI *et al.*, 2011), para cárie dentária (CATTEAU *et al.*, 2012; PAPANDREOU *et al.*, 2013; e para obesidade (PAPANDREOU *et al.*, 2013). GONÇALVES *et al.* (2012) observaram valores de pH variando de 2,9 e 3,5 para sucos de uva de formulação em pó ou concentrados. O trabalho mostrou através de avaliações de dureza e microdureza da superfície do esmalte dental submetido a desafios erosivos com sucos de uva que os sucos avaliados apresentaram potencial erosivo.

Neste contexto de aumento de consumo de bebidas pronta este trabalho procurou avaliar os efeitos de sucos de uva integrais (100% uva) e reconstituído (30% uva e com aditivos) na estrutura das proteínas salivares e na composição da película dental adquirida formada *in vitro*. Os resultados

poderão contribuir futuramente para compreender como os componentes da dieta podem influenciar na susceptibilidade dos indivíduos a cárie e erosão.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é investigar o efeito dos sucos de uva integral e suco de uva reconstituído sobre a estrutura das proteínas salivares e as consequências na composição da PDAE.

Os específicos:

- 1) Avaliar as alterações de solubilidade e estruturais das proteínas salivares quando adicionado sucos de uva integral ou reconstituído em diferentes proporções a saliva
- 2) Avaliar as alterações de composição e estrutura das PDAE formadas em presenças de mistura saliva: suco em diferentes proporções.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SALIVA

##### 3.1.1 Composição

A saliva total é um fluido corporal único, que constantemente banha a superfície da cavidade bucal, orofaringe e laringe. É uma mistura complexa derivada da secreção das glândulas salivares, fluido gengival, mucosa da cavidade nasal e faringe, bactérias orais não aderentes, restos alimentares, células epiteliais descamadas e células sanguíneas, bem como traços de medicações e produtos químicos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; CASTAGNOLA *et al.*, 2011). A saliva tem origem nas glândulas salivares maiores e menores. As glândulas salivares maiores incluem o par de glândulas parótidas, que estão localizadas próximo à região dos primeiros molares superiores, e as glândulas submandibulares e sublinguais que são encontradas no assoalho da cavidade oral (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; CASTAGNOLA *et al.*, 2011). A porção orgânica da saliva é formada em sua maior parte por proteínas, glicoproteínas, lipídeos e carboidratos. Já a parte inorgânica é representada por íons bicarbonato, fosfato, hidrogênio, cálcio e flúor. A concentração de proteínas na saliva é dependente da produção na glândula, hora do dia, gênero e estado de saúde do indivíduo (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995 ; VITORINO *et al.*, 2004). O principal componente proteico encontrado no fluido salivar é a  $\alpha$ -amilase, que representa cerca de 60% do conteúdo proteico total da saliva. Outras proteínas encontradas na saliva são a lactoferrina, imunoglobulinas, anidrases carbônicas, albumina e uma grande variedade de peptídeos que incluem cistatinas, estaterina, lisozimas e uma ampla classe de peptídeos típicos, as proteínas ricas em prolina (PRPs). Além disso, é possível encontrar na saliva pequenos peptídeos devido à atividade proteolítica da saliva (PERINPANAYAGAN *et al.*, 1995; VITORINO *et al.*, 2004).

A composição e o volume de fluxo salivar podem modificar a susceptibilidade do hospedeiro à cárie dental uma vez que auxiliam na diluição de alimentos, neutralizam e tamponam ácidos orgânicos (HARA; ZERO, 2010).

A porção orgânica da saliva contém agentes antimicrobianos como a imunoglobulina A (IgA), lisozima, lactoferrina e peroxidases. A lisozima pode levar à bacteriólise por quebrar a parede das células. A lactoferrina liga-se ao ferro, interferindo no crescimento bacteriano de espécies ferro-dependentes e mecanismos independentes. As estaterinas, as proteínas ricas em prolina (PRPs), as histatinas e as cistatinas mostram ter uma alta afinidade à superfície do esmalte e estão potencialmente envolvidas no processo de remineralização por suportar um ambiente favorável ao cálcio e ao fosfato (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995; HARA; ZERO, 2010). Além disso, os componentes orgânicos da saliva também auxiliam na lubrificação, digestão, deglutição e paladar.

Uma considerável porção das proteínas da saliva deriva da corrente sanguínea, entrando por difusão, filtração ou transporte ativo através do fluido crevicular gengival. Por si só, este fato poderia indicar que a saliva pode ser considerada um “espelho” do corpo humano; todavia, a imagem deste espelho pode ser distorcida, uma vez que a saliva tem uma composição variável (ZOLOTUKHIN, 2013; MILLER *et al.*, 2010).

A principal ação dos componentes inorgânicos é a manutenção da integridade do esmalte. O bicarbonato, como componente orgânico, desempenha importante papel na capacidade de tampão da saliva. O bicarbonato age aceitando íons de hidrogênio para formar o ácido carbônico, diminuindo a concentração de dióxido de carbono na saliva e fazendo com que mais bicarbonatos se liguem à íons hidrogênio (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995; NIEW AMEROGEN, 2004; HARA; ZERO, 2010;). O cálcio origina-se na saliva a partir da secreção pelos ácinos e participa do equilíbrio entre os fosfatos de cálcio do tecido dentário duro. O fosfato inorgânico da saliva funciona como solvente de fosfatos de cálcio e tem papel também na capacidade de tamponamento da saliva. O fluoreto, cujo papel nos processos de remineralização e desmineralização já foi amplamente discutido na literatura pode estar presente em grandes concentrações na saliva, mesmo que pequenas quantidades de fluoretos se dissolvam no baixo volume residual da saliva (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).



A interação entre proteínas salivares pode fazer com que haja modificação em sua estrutura e função biológica, e sua interação com componentes da dieta pode modificar a estrutura e composição de proteínas da saliva (NIEW AMEROGEN, 2004; PROCTOR *et al.*, 2005; OPPENHEIM *et al.*, 2007;; KOŚCIELNIAK *et al.*, 2012).

A composição da saliva é dinâmica e pode ser influenciada por uma série de fatores fisiológicos que podem incluir o volume de fluxo salivar, o tipo e o tamanho da glândula salivar que secretou a saliva, duração e origem do estímulo, dieta, idade, gênero, tipo sanguíneo e estado fisiológico do indivíduo (SCHIPPER *et al.*, 2007; ZOLOTUKHIN, 2013).

Variações na composição e o volume de fluxo salivar podem modificar a susceptibilidade do hospedeiro à cárie dental uma vez que auxiliam na diluição de alimentos, neutralizam e tamponam ácidos orgânicos (HARA; ZERO, 2010).

### 3.1.2 Funções da saliva

A saliva é composta por uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos. Também são encontradas na saliva imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados, como ureia e amônia (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001) As funções destes componentes são descritas na Tabela 1.

**TABELA 1.** Componentes da saliva e suas respectivas funções

<b>Componentes</b>	<b>Funções</b>
<b>Bicarbonatos, Fosfatos e Uréia</b>	Modulação do pH e da capacidade de tamponamento da saliva
<b>Proteínas e Mucinas</b>	Limpeza, agregação e/ou adesão de micro-organismos; contribuição no metabolismo da biofilme
<b>Cálcio, Fosfato e Proteínas</b>	Ação sinérgica dos três componentes como fator de anti-solubilização; e fatores moduladores de remineralização e desmineralização.
<b>Imunoglobulinas, Proteínas e Enzimas</b>	Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiviral

A saliva também pode incentivar a reparação de tecidos moles, reduzindo o tempo de coagulação e acelerando a cicatrização da ferida. A função protetora da saliva é resultado da manutenção do equilíbrio ecológico na cavidade oral através de desbridamento/lavagem; atividade antibacteriana e antifúngica, agregação e aderência diminuídas por meios imunológicos e não-imunológicos e atividade antibacteriana direta. A manutenção da integridade do dente pela saliva decorre da limpeza mecânica, desembaraço dos hidratos de carbono e da maturação pós-eruptiva do esmalte. que desempenham papéis nos processos de remineralização, inibição da desmineralização, proteção e

lubrificação da superfície do esmalte (MANDEL, 1987; NIEW AMEROGEN, 2004).

### 3.2 PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA DO ESMALTE

#### 3.2.1 Composição da película dental adquirida do esmalte (PDAE)

A PDAE é um filme proteico fino e acelular que se forma na superfície dentária em função de exposição ao ambiente oral. Consiste predominantemente de proteínas salivares, mas também inclui proteínas não derivadas da saliva, carboidratos e lipídios (SIQUEIRA *et al.*, 2012; JAGER *et al.*, 2013). A película confere proteção contra ácidos, formando uma barreira contra íons  $H^+$ , evitando a dissolução da hidroxiapatita (JAGER *et al.*, 2013). As proteínas da película dental adquirida do esmalte podem atuar como tampões, ligando íons  $H^+$ , e a película pode atuar como barreira de permeabilidade seletiva, de forma a retardar o movimento de íons carregados positivamente como  $Ca^{2+}$ , e ao mesmo tempo restringindo a abordagem de íons  $H^+$  (ZHRADNIK *et al.*, 1976; WHITE *et al.*, 2010; JAGER *et al.*, 2013;).

A composição e estrutura da película dental adquirida tem sido estudada por microscopia (SCHÜPBACH *et al.*, 2001) análise de aminoácidos (MAYHALL, 1975; RYKKE *et al.*, 1990), gel-filtração e cromatografia de troca iônica, eletroforese e *immunoblotting* (EGGEN & ROLLA, 1982; EGGEN & ROLLA, 1983; LEE *et al.*, 2013).

Segundo Lee *et al.* (2013), a maior limitação para os estudos com PDAE consiste na dificuldade em obter quantidades suficientes de material para caracterização bioquímica. Entretanto, o desenvolvimento de metodologias para estudos de proteômica possibilitaram estes autores superar esta dificuldade e mostrar que a composição de aminoácidos de películas de diferentes sujeitos é similar.

Diversos estudos foram realizados para determinar a composição proteica da película dental adquirida e 130 proteínas foram identificadas por análise proteômica (NIEW; AMEROGEN, 2004; HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2007; HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2012 ). Dentre as proteínas identificadas na película, somente 14,4 % derivam de glândulas salivares exócrinas, 67,8% de células e 17,8% do soro sanguíneo chegam à saliva pelo fluido crevicular gengival (BUZALAF *et al.*, 2012). Algumas proteínas da película dental adquirida incluem: aglutinina, catelicidina (LL37), Cistatinas (VEGh), Defensinas, EP-GP, Histatinas, Imunoglobulinas (IgA secretora, IgG/IgM), Lactoferrina, Lactoperoxidase, Lisozima, MUC5B ( Mucina MG1), MUC7 (Mucina MG2), Glicoproteína rica em prolina, Proteínas ricas em prolina (aPRP), Proteínas ricas em prolina (bPRP) e estaterina (NIEW; AMEROGEN, 2004; HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2007; HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2012). A Tabela 2 descreve as funções das principais proteínas salivares.

**TABELA 2.** Principais proteínas da PDAE e suas funções.

<b>Proteínas da Película</b>	<b>Funções</b>
<b>Agglutinina</b>	Agregação de bactérias
<b>Catelicidina (LL37)</b>	Morte de bactérias de amplo espectro
<b>Cistatinas (VEGh)</b>	Inibidor de protease
<b>Defensinas</b>	Morte de bactérias de amplo espectro
<b>EP-GP</b>	Desconhecidas
<b>Histatinas</b>	Morte de bactérias de amplo espectro
<b>Imunoglobulinas</b>	Inativação e agregação de bactérias
<b>Lactoferrina</b>	Propriedades antibacterianas
<b>Lactoperoxidase</b>	Inibição de crescimento
<b>Lisozima</b>	Morte celular

<b>MUC5B (Mucina MG1)</b>	Barreira de difusão de prótons
<b>MUC7 (Mucina MG2)</b>	Agregação
<b>Glicoproteína rica em prolina</b>	Desconhecida (Agregação?)
<b>Proteínas ricas em prolina (aPRP)</b>	Aderência
<b>Proteínas ricas em prolina (bPRP)</b>	Desconhecida (Interfere na membrana?)
<b>Estaterina</b>	Aderência

A  $\alpha$ -amilase é uma proteína que é secretada principalmente pela glândula parótida nas isoformas glicosilada e não glicosilada. Análise de espectrometria de massa das várias isoformas da  $\alpha$ -amilase salivar revelou que a família de proteínas da amilase contém mais espécies do que previamente estimado (HARDT *et al.*, 2005; HELMERHORST *et al.*, 2007). Além de funcionar como enzima digestiva, a  $\alpha$ -amilase tem capacidade de se ligar a alguns microrganismos, como o *Streptococcus gordonii* (antes chamado de *Streptococcus sanguis* genótipo I), *Streptococcus mitis* genótipo II e *Streptococcus oralis*. A  $\alpha$ -amilase salivar também é constituinte da película adquirida do esmalte formada *in vivo*, e da película da mucosa, na qual as formas glicosiladas e não glicosiladas, respectivamente, predominam (AL-HASHIMI; LEVINE, 1989; HELMERHORST *et al.*, 2007).

A glicoproteína rica em prolina (GRP) é a proteína glicosilada mais proeminente nas secreções de saliva da glândula parótida, e está presente na saliva nas mais diversas isoformas, sendo as isoformas de 39 e 89 kDa as mais frequentes (HELMERHORST *et al.*, 2007). Assim como, as GRP, as Proteínas ricas em Prolina (PRPs), estão relacionadas à propriedade de lubrificação, comum à todas as proteínas altamente glicosiladas (HATTON *et al.*, 1985; LEVINE *et al.*, 1987; HELMERHORST *et al.*, 2007).

Mucinas salivares e outras glicoproteínas tem alta propensão a formar complexos homotípicos e heterotípicos com outras proteínas, como a  $\alpha$ -amilase, estaterina, IgA, entre outras. A MG2 (MUC7) forma complexos com a sIgA,  $\alpha$ -amilase, PRP2 ácida, PRP3 básica, estaterina, histatina 1, e lactoferrina. Muitos dos complexos proteína-proteína ligam-se às bactérias auxiliando na sua aglutinação e liberação destas da cavidade oral (HELMERHORST *et al.*, 2007).

### 3.2.2 Formação da película dental adquirida do esmalte

A formação da PDAE é um processo altamente seletivo e dinâmico, influenciado por diversos fatores, incluindo ciclo circadiano, composição da microflora oral, capacidade proteolítica do ambiente oral e propriedades físicas e químicas das superfícies dentárias (SIQUEIRA *et al.*, 2012). A formação da película dental adquirida inicia-se alguns minutos após a exposição à saliva total e é caracterizada por um aumento na espessura da película de 10 a 20 nm dentro de poucos minutos, mantendo-se estável por aproximadamente 30 minutos (LENDENMANN *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Neste estágio ocorrem interações eletrostáticas das proteínas salivares com a hidroxiapatita. Estas proteínas são conhecidas como as proteínas precursoras da película (HAY *et al.*, 1973; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

A saliva é supersaturada com relação a íons cálcio e fosfato. Íons salivares podem influenciar na adsorção de proteínas e formação da PDAE (MARTINS *et al.*, 2013). A adsorção seletiva de íons salivares sobre a superfície do esmalte resulta na formação da película dental adquirida (; HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2012 ; MARTINS *et al.*, 2013). Tanto os íons cálcio como os íons fosfato são importantes para proteção da superfície dentária contra a desmineralização. A carga negativa da superfície do esmalte é imediatamente neutralizada por uma camada de íons com carga positiva. Estes íons, em especial os íons de cálcio, são conhecidos como íons da camada de hidratação e auxiliam na adsorção de

proteínas/peptídeos a superfície dental dando origem a película dental adquirida (HAY, 1973; MARTINS *et al.*, 2013;).

O processo dinâmico de formação da película adquirida, que envolve adsorção e dessorção de proteínas leva aproximadamente 2 horas e envolve proteínas de alto peso molecular (*High Molecular Weight Proteins*, HMW) (CHEAIB; LUSSI, 2011). Proteínas salivares maiores, como a mucina, substituem proteínas menores adsorvidas, como a estaterina e proteínas ricas em prolina ácidas para se incorporarem à superfície da película (CHEAIB; LUSSI, 2011).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que as proteínas aPRPs, estaterinas e histatinas como sendo as primeiras a adsorverem à hidroxiapatita. Mucinas (MUC5B e MUC7),  $\alpha$ -amilase, cistatina, lisozima e lactoferrina foram as proteínas mais abundantes na PDAE formada *in situ* (JENSEN *et al.*, 1992; LAMKIN *et al.*, 1996; SCHÜPBACH *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Relação entre proteínas da saliva e proteínas da PDAE

Vários estudos mostraram a relação entre as proteínas presentes na saliva e as da PDAE (JENSEN *et al.*, 1992; SCHENKELS *et al.*, 1995; LENDENMANN, *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2003; HANNIG; JOINER, 2006). Os componentes identificados na saliva total incluíram cistinas, estaterinas, albumina, amilase e calgranulina A. Os componentes da película incluíram histatina, lisozima, estaterina, citoqueratina e calgranulina B (YAO *et al.*, 2003). Amilase, proteínas ricas em prolina (PRPs) ácidas, estaterina e histatina são provenientes da película derivada da saliva da parótida (JENSEN *et al.* 1992). As proteínas que compõem a película derivada da saliva da submandibular são similares daquelas derivada da parótida exceto pela presença de cistatina e ausência de PRPs ácidas (JENSEN *et al.* 1992). Já a película derivada da saliva total é diferença na composição, constituindo-se de  $\alpha$ -amilase, PRPs ácidas, cistatina e peptídeos proteolíticos derivados (JENSEN *et al.* 1992). A IgA secretora, mucina, lactoferrina, lisozima, albumina, anidrase

carbônica, complemento C3/C3c também foram encontradas na película (LENDENMANN *et al.*, 2000).

A composição proteica da película afeta significativamente sua função, incluindo sua capacidade potencial de transportar íons, a regulação do sistema de cristalização de cálcio-fosfato, e a aderência bacteriana (HANNIG; JOINER, 2006; CHEAIB; LUSSI, 2011).

Maior quantidade de proteínas intactas foram detectadas na PDAE formada *in vitro* do que nas formadas *in vivo* ou *in situ*. Provavelmente, isso ocorre devido aos processos de maturação da película que acontecem durante a formação da película *in vivo*. Enzimas imobilizadas na película, como a transglutaminase, parecem estar envolvidas neste processo, com impacto nas propriedades protetoras da película (HANNIG *et al.*, 2011).

#### 3.2.4 Funções da Película Dental Adquirida do Esmalte

A formação de uma interface protetora entre a superfície dentária e o ambiente oral é provida pela PDAE, que age como uma barreira seletiva de permeabilidade, regulando os processos de mineralização/desmineralização e determina a composição de microrganismos do biofilme que se forma sobre a superfície dentária (HANNIG; JOINER, 2006; MARTINS *et al.*, 2013).

A película dental adquirida serve como uma barreira protetora natural contra o processo de erosão dentária, que consiste na perda de tecidos mineralizados por ácidos, sem a intervenção de bactérias (CHEAIB; LUSSI, 2011). A PDAE funciona como uma barreira difusora que previne o contato direto entre ácidos e a superfície do esmalte (CHEAIB; LUSSI, 2011). Várias proteínas salivares parecem estar envolvidas no processo de inibição da desmineralização do esmalte dentário, com um papel protetor que é dependente da adsorção seletiva dessas proteínas salivares sobre a superfície do esmalte (SIQUEIRA *et al.*, 2012).



A colonização do biofilme inicia-se com uma adesão passiva das bactérias salivares as proteínas da película. As proteínas ricas em prolina (PRPs) e a estaterina servem como receptores de ancoragem para os microrganismos que se prendem firmemente à superfície por meio de forças iônicas, hidrofóbicas, eletrostáticas e de Van der Waals. Após a adesão dos colonizadores iniciais, o biofilme começa a aderir novas espécies, como bacilos gram-negativos, alguns patogênicos (GARCIA-GODOY; HICKS, 2008). O processo de amadurecimento do biofilme acontece através de coagregação, que é a interação célula-célula mediada por adesinas (ROSAN; LAMONT, 2000). Deste modo, a película dental adquirida serve como substrato para a adesão bacteriana, iniciando a formação do biofilme; contando com o auxílio de alguns componentes salivares no processo de adesão bacteriana (GARCIA-GODOY; HICKS, 2008).

### 3.2.5 Interferência da dieta na PDAE

Após a formação da película e com o decorrer do tempo, a película passa por mudanças (JOINER *et al.*, 2004). A dieta tem papel importante no processo de modificação da composição da película (VACCA; BOWEN, 2000; JOINER *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2012). O Quadro 4 resume o efeito dos componentes da dieta sobre a composição e atividade da PDAE

**QUADRO 1.** Resumo dos estudos de interferência de componentes da dieta na PDAE.

<u>Autor</u>	<u>Tipo de Estudo</u>	<u>Objetivo</u>	<u>Resultado</u>
Amaechi <i>et al.</i> , 1999	<i>in situ</i>	Avaliar relação entre espessura da película e susceptibilidade à erosão com suco de laranja;	Dieta influenciou na espessura da película. Película é um fator protetor contra erosão
Finke <i>et al.</i> , 2002.	<i>in situ</i>	Investigar a influência do tempo de exposição de bebidas gaseificadas na espessura e morfologia da película.	O consumo de certas bebidas aumentou a espessura da película
Hannig, Balz <i>et al.</i> , 1999	<i>in vivo</i>	Investigar efeito protetor da película contra o ácido cítrico	Película protegeu contra erosão causada por aplicação de ácido cítrico
Hannig <i>et al.</i> , 2003	<i>in situ</i>	Influência do tempo de formação da película na desmineralização do	A resistência ácida da película aumenta com o aumento do tempo de formação

esmalte					
Hemingway <i>et al., 2010</i>	<i>in vitro</i>	Investigar	efeito da caseína e ovoalbumina na erosão do esmalte <i>in vitro</i>	da e se mostram promissoras como aditivos anti-erosivos para bebidas	Caseína e ovoalbumina
Hannig <i>et al., 2004</i>	<i>in situ</i>	Investigar	o efeito protetor de películas formadas em curto período de tempo	o efeito Película formada em 3 minutos pode reduzir a influência erosiva do ácido cítrico, mas não inibir	Película formada em 3 minutos
Hara <i>et al., 2006</i>	<i>in situ</i>	Investigar	se uma película de 2hs protege contra o efeito do ácido cítrico	uma Película mostrou efeito protetor, em situações de menor desafio erosivo	Película mostrou efeito protetor
Khan e Mukhtar, 2007	Revisão	Revisar	achados recentes sobre propriedades medicinais e benefícios dos chás	Os chás mostraram um efeito cariostático	Os chás mostraram um efeito cariostático
Proctor <i>et al., 2005</i>	<i>in vitro</i>	Avaliar	a interação de proteínas da saliva com polifenóis do chá preto	Polifenóis do chá preto interagem com a película mudando sua estrutura e função	Polifenóis do chá preto

Hannig <i>et al.</i> , 2008	<i>in situ</i>	Avaliação do efeito do chá do gênero <i>cistus</i> na formação inicial do biofilme oral após bochecho por 10'	Bochecho com o chá diminuiu a atividade de peroxidase na película
Joiner <i>et al.</i> , 2003, 2004 e 2006	<i>in vitro</i>	Avaliação da ação de polifenóis na película	Componentes do chá e do vinho se ligaram fortemente à proteínas da película, aumentando sua espessura.
Vacca-Smith, 1994	<i>in vitro</i>	Determinar se a caseína adere à hidroxiapatita na presença de saliva ou leite e como estas proteínas afetam a aderência do <i>S. mutans</i>	As $\alpha$ , $\beta$ e $\kappa$ -caseínas do leite bovino competem com as proteínas da saliva para ligação a hidroxiapatita
Vacca-Smith & Bowen, 2000	<i>in situ</i>	Investigar o efeito do leite e da kappa-caseína na película salivar formada em discos de HA <i>in situ</i>	O leite bovino e <i>k-caseína</i> interagem com HA e reduzem a atividade da glucosiltransferase adsovida a HA
Devold <i>et al.</i> , 2006	<i>in vitro</i>	Avaliar as propriedades de adsorção de proteínas do leite e do iogurte	Proteínas do iogurte não foram capazes de adsorver ao esmalte; Incubação em saliva não inibiu formação de

		película formada no esmalte <i>in vitro</i>	película com leite;
Haukioja <i>et al.</i> , 2008	<i>in vitro</i>	Avaliar <i>in vitro</i> se bactérias probióticas usadas em produtos comerciais afetam a composição proteica de películas salivares e a aderência de outras bactérias	Bactérias probióticas podem afetar a ecologia por prevenir a aderência de bactérias e modificando a composição da película
Wernersson <i>et al.</i> , 2006	<i>in vivo</i>	Avaliar se o leite humano promove adesão de <i>S. mutans</i> à cobertura por saliva	Algumas proteínas do leite humano aderem a HA (IgA secretora, BSSL -lipase estimulada por sais biliares, lactoferrina, albumina, $\beta$ -caseína e lisozima)
Teixeira <i>et al.</i> , 2006; 2007	<i>in vitro</i>	Avaliar o potencial de duas lectinas de alga a inibir a aderência de cinco espécies de <i>Streptococos</i>	As lectinas das algas adsorvem na película e são capazes de inibir a aderência de <i>Streptococos</i>
Van der Mei, 2010	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Influência de dentífricos componentes da dieta nas propriedades	de Leite e óleo de salada: e aumentou a hidrofobicidade da película; Solução de açúcar: maior

	saliva	hidrofilicidade
Hannig, Wagenschwanz et al., 2012	<i>in situ</i>	Efeito do óleo de girassol nas propriedades da película formada <i>in situ</i>
		Película sozinha reduziu o potencial erosivo; óleo de girassol reduziu efeito protetor
Hannig et al., 2012	<i>in situ</i>	Efeito de óleos comestíveis na colonização inicial da superfície do esmalte
		Bochechos com óleos não mudaram o padrão de colonização bacteriana em 8h
Siqueira et al., 2012	<i>in vitro</i>	Verificar a influência do flúor na formação da película dental adquirida
		A concentração de importantes proteínas salivares presentes na película diminuiu com a presença de Flúor
Yao et al., 2012.	<i>in situ</i>	Efeito da fruta tropical Carica Papaya no pH, força iônica e hidrólise da Película Adquirida.
		As películas formadas foram removidas completamente ou foram deformadas na presença da fruta.

Hannig <i>et al.</i> , 2009	<i>in situ</i>	Investigar alterações e propriedades da película durante o consumo de bebidas ácidas	Sucos são menos danosos que refrigerantes de baixo pH. Proteínas são primordiais no des-re
-----------------------------	----------------	--	--

### 3.2.6 Polifenóis

Entre os componentes da dieta que interagem com componentes da saliva e da PDAE estão os polifenóis. Estes compostos estão presentes em cereais e legumes (centeio, milho, nozes, aveia, arroz, sorgo, trigo, feijão), oleaginosas (colza, canola, semente de linhaça, semente de azeitona) frutas, vegetais e bebidas (sucos de frutas, chás, café, cacau, cervejas e vinhos) (SHI *et al.*, 2003). Maçãs, peras e uvas contêm ácido cafeico e cumárico. Além disso, enquanto as maçãs e peras são ricas em ácido clorogênico as uvas são ricas em ácido gálico (SHI *et al.*, 2003).

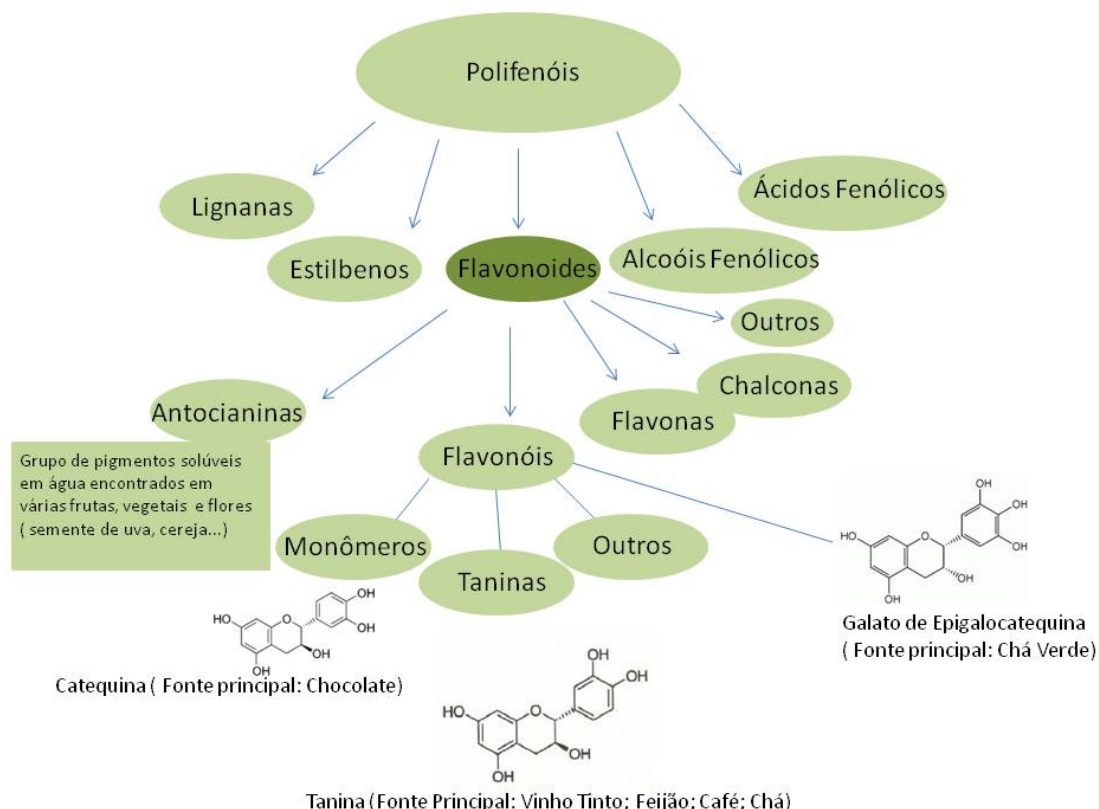
Os polifenóis apresentam propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anti-cariogênicas (revisado por FERRAZZANO *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos são os mais abundantes metabólitos secundários de plantas (SHI *et al.*, 2003). Eles são produzidos como mecanismo de defesa à agressão física e microrganismos. Em alimentos e bebidas são associados com as sensações de amargo, adstringência e cor (revisado por GOLLÜCKE, 2010). As substâncias fenólicas ou polifenóis incluem compostos que variam de ácidos fenólicos coloridos como as antocianinas, flavonóides simples a flavonóides complexos, sendo que todos os compostos fenólicos contêm um anel aromático e uma ou mais hidroxilas (Figura 1) (revisado SHI *et al.*, 2003). Os polifenóis de maior interesse

nutricional são os ácidos fenólicos, flavonóides e estilbeno (revisado por GOLLÜCKE, 2010).

O consumo e produção de sucos de uva, bebidas ricas em polifenóis, triplicou de 2004 para 2011 (IBRAVIN/SEAPA/MAPA – RS, 2011, LAGO-VANZELA *et al.*, 2011). O consumo de sucos de frutas industrializados com adoçantes é maior do que o consumo de suco de frutas 100% naturais (PAPANDREOU *et al.*, 2013), e esse consumo pode ser fator de risco para erosão dentária (OKUNSERI *et al.*, 2011), para cárie dentária (CATTEAU *et al.*, 2012; PAPANDREOU *et al.*, 2013) e para obesidade (PAPANDREOU *et al.*, 2013). Assim, este trabalho estudará o efeito do suco de uva sobre as proteínas salivares e da PDAE.

**FIGURA 1.** Classificação dos polifenóis



Fonte: O Autor (Adaptado de FERRAZZANO *et al.*, 2011)



### 3.2.7 Composição da uva

O suco de uva tem altos valores de açúcar, glucose e frutose. O açúcar é formado como reserva na planta e sintetizado nas folhas pela ação da luz solar no período de maturação das bagas (POMMER, 2003; SANTANA *et al.*, 2008). A acidez do suco é consequência da presença dos ácidos cítrico, tartárico e málico, cujas concentrações variam de acordo com condições climáticas, condições de cultivo, entre outras. Esses ácidos orgânicos conferem ao suco de uva baixo pH e um equilíbrio entre os gostos doce e ácido (SANTANA *et al.*, 2008). Além disso, os sucos de uva orgânico e convencionais apresentam alto conteúdo de polifenóis (MACHADO *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos da uva e seus produtos como sucos e vinhos podem ser divididos em dois grupos: a) ácidos fenólicos e compostos relacionados e b) flavonóides. Os ácidos fenólicos mais comuns na uva são os ácidos cinamínicos: ácido cumárico, cafeico, ferúlico, clorogênico e neoclorogênico e ácidos benzóicos: *p*-hidroxibenzóico, protocatecólico, gálico e gálico. Os flavonóides incluem as flavona-3-ols incolores, como as catequinas, epicatequinas e seus ésteres formados com glucose e ácido galáctico e as flavonas coloridas como a queracetina, flavona mais abundante nos alimentos e as antocianinas vermelhas e azuis (revisado SHI *et al.*, 2003).

LAGO-VANZELA *et al.*, (2011) observaram que as uvas bordo apresentam altas quantidades de compostos fenólicos, como ácido gálico na cascas. As antocianinas localizadas na casca mais abundantes (90% do total) foram as derivadas do grupo 3,5-diglucosídeo com altas concentrações de malvidina 3,5 – diglucosídeo e o seu derivado *p*-coumaroil. Os flavonóides foram encontrados principalmente na casca e a miriquetina 3-glucosídeo foi o principal derivado detectado tanto na casca como na polpa da uva. Os ácidos hidroxicinâmicos e os seus derivados provenientes principalmente do ácido cafeico foram observados na casca em quantidades dez vezes superiores as observadas na polpa. O resveratrol e seu 3-glucosídeo (piceido) foram encontrados apenas na casca da uva bordô, sendo esta uva considera uma alta produtora deste polifenol.

O extrato da semente da uva é uma fonte rica de proantocianidina (PA), substância naturalmente presente em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e cascas. A PA é um polifenol capaz de fortalecer tecidos colagenosos. A PA presente no cranberry também é capaz de inibir a atividade das glucosiltransferases adsorvidas, a produção de ácidos por *S. mutans*, além de aumentar a síntese de colágeno. O extrato de semente de uvas também é capaz de inibir ou de paralisar cárie radicular e reduz a formação de biofilmes por *S. mutans* (KOO *et al.*, 2010)

A uva passa é uma fonte rica de polifenóis, flavonóides, ferro, sódio, minerais, potássio, cálcio e algumas vitaminas B que contribuem em geral para a saúde humana (DUARTE *et al.*, 2006; WU, 2009). Polifenóis interagem com proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e alguns alcaloides. Os polifenóis tem a capacidade de precipitar proteínas de soluções aquosas (WROBLEWSKI *et al.*, 2001). Alguns estudos mostram que os polifenóis interagem com as Proteínas Ricas em Prolina (PRPs) (KALITHRAKA *et al.*, 2001; SCHWARTZ ; HOFMANN, 2008; LEE *et al.*, 2012). A interação entre polifenóis e proteínas pode ser influenciada por diversos fatores, como peso molecular, conformação molecular, proporção molecular entre polifenóis e proteínas, pH e conteúdo de ácidos inorgânicos (SHI; DI, 2000). A saliva tem uma alta proporção de proteínas ricas em prolina (PRPs). PRPs ácidas, juntamente com histatinas e estaterinas, tem uma alta afinidade por hidroxiapatita, e são componentes que se destacam na composição da PDAE. PRPs, em especial PRPs básicas e as histatinas tem afinidade alta por polifenóis da dieta (HAGERMAN; BUTLER, 1981; BENNICK ;YAN, 1995; PROCTOR *et al.*, 2005). As interações acontecem entre por reações dos anéis de prolina e os polifenóis (WROBLEWSKI *et al.*, 2001; PROCTOR *et al.*, 2005). O desaparecimento de certas proteínas ricas em prolina e histatinas de perfis eletroforéticos em presença de polifenóis pode ser explicado pela formação de complexos proteína-polifenol altamente solúveis que precedam essa eventual precipitação. Ainda, a eletroforese das mesmas proteínas em condições de redução mostrou um perfil normal das proteínas salivares, sugerindo que o desaparecimento de certas proteínas salivares não estava relacionado com degradação proteolítica (WILLIAMSON, 1994; PROCTOR *et al.*, 2005).

Proteínas salivares específicas aderem à superfície da hidroxiapatita e esta película de proteínas salivares é um agente protetor que mantém a integridade do esmalte por reduzir a abrasão mecânica e a dissolução de mineral. No entanto, a adesão de proteínas associadas aos polifenóis é fator potencial para causar manchamento (PROCTOR *et al.*, 2005).

### 3.2.8 Ácidos em alimentos e bebidas

O ácido cítrico, os sais sódio, potássio e cálcio são comumente aplicados como conservantes de alimentos, em especial nas bebidas industrializadas. Eles são geralmente usados para inibir crescimento de fungos, também sendo efetivos contra um amplo espectro de bactérias. Esses compostos são mais ativos em alimentos com valores baixos de pH e são essencialmente não efetivos em alimentos com pH neutro (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Como um aditivo, o ácido cítrico é utilizado como agente de sabor e conservante em alimentos e bebidas, principalmente em sucos. O ácido cítrico está presente em sucos de uva (RIZZON; MIELE, 1995). A composição química da uva pode variar largamente por influência de fatores climáticos, geológicos, cultivacionais, relativos à variedade da uva, dentre outros (SOYER *et al.*, 2003). A presença dos ácidos tartárico, málico e cítrico nos sucos de uva é o que determina a acidez da bebida. Esses ácidos orgânicos lhe conferem um baixo pH, equilibrando o paladar entre doce e ácido (RIZZON; MIELE, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Ácidos orgânicos tem importantes efeitos no sabor característico da fruta e tem papel importante em critérios de qualidade tais como estabilidade, cor e sabor (ROMERO; MUÑOZ, 1993; SOYER *et al.*, 2003.).

Em frutas, o conteúdo total de ácido geralmente alcança um máximo durante o crescimento e diminui durante o amadurecimento. O clima é fator crítico na concentração total de ácido. Uvas com o mesmo genótipo criadas em ambientes com climas diferentes tem concentrações de ácido diferentes. Condições de temperatura aumentada durante o amadurecimento da uva resultam em um conteúdo de ácido menor em sua maturidade, devido ao desencadeamento do aumento da degradação de ácido málico (KANELLIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993; FULEKI *et al.*, 1993, SOYER *et al.*, 2003).

A presença de ácido cítrico nas bebidas esta associada com o seu potencial erosivo (MAGALHÃES *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2014). Com o abaixamento do pH causado pela bebida, ocorre a desmineralização superficial da hidroxiapatita. Em geral o efeito do pH destas bebidas sobre o esmalte são amplamente relatadas (KITCHENS; OWENS, 2007; SALES-PERES *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2014; Entretanto, o pH também tem efeito desnaturante de proteínas e como tal pode mudar a composição orgânica da saliva e da película dental adquirida. Além disso, o suco de uva é uma bebida rica em polifenóis que também precipitam proteínas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi submetido a apreciação e aprovado no comitê de ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, (Parecer 178.743) em 2012.

#### 4.1.1 Consentimento informado e esclarecido

Os objetivos da pesquisa foram explicados pessoalmente aos voluntários, e após concordarem em participar, assinaram o termo de consentimento informado e esclarecido. As eventuais dúvidas foram esclarecidas pessoalmente pela equipe de pesquisa.

#### 4.1.2 Voluntários

Este estudo contou com a participação de 13 voluntários, 8 do sexo feminino, e 5 do sexo masculino, com idades entre 20 e 43 anos, com saúde bucal (sem cárie ou doença periodontal).

### 4.2 Coleta da saliva dos voluntários

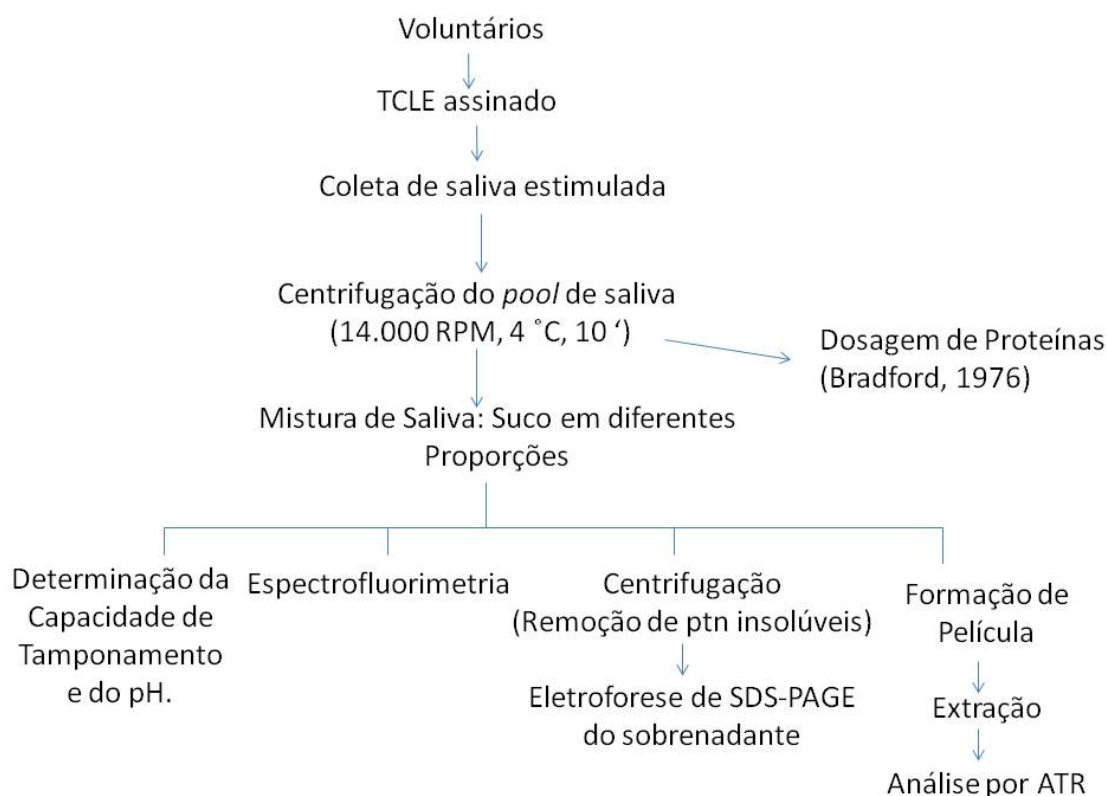
Para a coleta de saliva, os voluntários realizaram a higiene oral prévia e permaneceram sem ingerir alimentos e bebidas por pelo menos 60 minutos previos à coleta de saliva.

A coleta de saliva estimulada foi realizada pelo método do *spitting*, até as 10:00 da manhã, horário coincidente com maior concentração de proteínas na saliva (DAWES, 1972). Cada voluntário, coletou aproximadamente 10 mL de saliva em frascos universais estéreis e as amostras foram mantidas em gelo durante todo o processo.

A saliva foi centrifugada a 14.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aliquotado em tubos falcon estéreis para a realização dos experimentos.

A estimativa da concentração de proteínas do *pool* de saliva foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando BSA (Soro-Albumina Bovina) como padrão para os cálculos. A amostra de saliva foi destinada para as diferentes análises: pH, análise da estrutura das proteínas na saliva por fluorescência, análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE e formação *in vitro* da película dental adquirida do esmalte (Figura 2)

**FIGURA 2.** Sequência dos experimentos realizados



#### 4.3 Seleção das bebidas

Amostras de sucos de uva (uva bordô, *Vitis labrusca*) integrais (100% uva, sem adição de água, adoçantes, corantes ou aromatizantes) e reconstituído (30% uva, com adição de água, açúcar, corantes e aromatizantes), e água mineral foram adquiridas das marcas comerciais selecionadas: Suco de Uva Tinto Integral Aliança, Refresco Del Valle Sabor Uva Água Mineral Ouro Fino de acordo os critérios de inclusão. A seleção visava encontrar dois sucos de características diferentes integral ( sem adição de água ou sacarose) e é constituído de 100% de uva e o reconstituído

(refresco), contém apenas 30% de uva em sua formulação. A marca Aliança foi a mais comumente encontrada nos mercados para a versão integral e por isso foi selecionada. O suco de uva reconstituído selecionado foi escolhido por ser a marca mais barata disponível no comércio em Curitiba – PR podendo ser a mais acessível para a população. Na aquisição do produto foram observadas as normas técnicas de sua conservação, a saber: prazo de validade, temperatura de armazenagem, acondicionamento e integridade das embalagens.

#### 4.4 Avaliação de parâmetros salivares durante a exposição aos sucos

##### 4.4.1 Determinação do pH da mistura saliva: suco

As amostras de bebidas selecionadas foram abertas apenas no momento em que os experimentos foram realizados, e misturadas aos sucos nas proporções estabelecidas.

O efeito da adição de sucos reconstituídos ou integrais de uva no pH da saliva foram determinados misturando o suco e saliva nas proporções: 10:1; 1:1; 1:10; 1:20; 1:50 e 1:100. As proporções foram estabelecidas para simular o que acontece na cavidade bucal desde o momento em que o suco é ingerido (aproximadamente 10 mL/gole) até que seja completamente removido da cavidade bucal pela capacidade de lavagem da saliva. O volume final das reações foi 3 mL. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37° C e o pH das misturas foi determinado em potenciômetro (Orion Research Co., Model 9609, Cambridge, MA, EUA) com eletrodo íon seletivo. Os valores foram registrados. As análises foram realizadas em três experimentos independentes.

O efeito da adição de pequenas quantidades das bebidas sobre o pH final da mistura suco:saliva, também foram analisados. Neste caso, foram utilizados 3 mL de saliva e as bebidas foram adicionadas em incrementos de 10 µL ou 50 µL e o pH foi mensurado, como mencionado anteriormente.

#### 4.4.2 Curva de titulação dos sucos e das misturas suco: saliva

A curva de titulação das bebidas foi realizada adicionando-se NaOH 0,1M as bebidas. O volume adicionado e o pH final de cada adição foram registrados para construção da curva de titulação.

O volume de base adicionado às misturas de diferentes proporções de suco: saliva para que estas atingissem o pH 7,0 foram registrados.

#### 4.4.3 Efeito da solução suco:saliva sobre a estrutura das proteínas salivares

Após a determinação dos pHs das misturas suco: saliva, estas foram mantidas em gelo. Em seguida, os perfis dos espectros de fluorescência foram monitorados por espectrofluorimetria (Espectrofluorímetro Shimadzu RF5301-PC, Tóquio, Japão, Software RF-PC) em espectros sincronizados de emissão e excitação para comprimentos de onda de 300 a 800 nm.

Além disso, para observar o efeito da adição de incrementos de suco sobre a estrutura as proteínas salivares foram realizados espectros de fluorescência com excitação a 282 nm e emissão de 200 a 800 nm em espectrômetro de dicroísmo circular (Espectrômetro JASCO, J-815 CD, Tóquio, Japão, Software Spectra Manager).



#### 4.4.4 Determinação do perfil de proteínas solúveis das amostras suco:saliva

O efeito da alteração do perfil proteico da saliva pela adição de sucos reconstituído ou integral foi observado através de eletroforese SDS-PAGE 15%. Para estes experimentos as amostras foram misturadas conforme descrito no item 4.4.1. e após a incubação de 10 minutos a 37° C foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 RPM (16.434,6 G-force) a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e alíquotas contendo 9 µg de proteínas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 15%. A corrida foi realizada em tampão Laemmli 1x (LAEMMLI, 1970), a 200 mV, por aproximadamente 80 minutos. Para visualização das proteínas os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976).

#### 4.5 Avaliação do efeito dos sucos na formação da película dental adquirida do esmalte *in vitro*

##### 4.5.1 Formação *in vitro* da película dental adquirida do esmalte

Estes experimentos foram realizados utilizando um *pool* de saliva coletada conforme descrito no item 4.2 O *pool* de saliva foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 14.000 RPM a 4°C por 10 minutos e em seguida incubado em shaker a 37°C com os sucos para verificar o efeito dos sucos no perfil proteico da saliva . A película dental adquirida foi formada *in vitro* sobre blocos de incisivos bovinos doados por frigorífico local, de animais previamente abatidos para consumo no comércio local (Frigorífico ARGUS – São José dos Pinhais, Paraná). Os dentes passaram por limpeza manual com curetas e profilaxia com pedra pomes e água destilada e foram armazenados em ambiente úmido e refrigerado (potes individuais contendo gaze umedecida em solução de timol a 0,1%, em geladeira). Dentes que apresentaram ao exame visual com auxílio de lupa fraturas ou trincas foram excluídos. Os dentes foram cortados em blocos de 5x5x1mm.

Para o experimento *in vitro* de formação de película sobre a superfície do esmalte amostras suco:saliva foram misturadas na proporção 1:1, com volume total de 4 mL para cada grupo.

A formação de película dental adquirida *in vitro* foi realizada pela incubação de cinco blocos de incisivos bovinos com a mistura suco: saliva na proporção 1:1, conforme descrito no item 4.4.1. Os espécimes foram imersos nas soluções e incubados em estufa a 37° C por 1 hora para formação de película.

#### 4.5.2 Extração da película dental adquirida

A película dental adquirida foi extraída dos espécimes com a utilização de membrana para ligação de proteínas (Hybond, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA), estéril, previamente embebida em solução de NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de Sódio) 0,5M e pH 8,0). As membranas foram armazenadas em placas de Petri para secar anteriormente às análises de espectroscopia das proteínas por reflectância total atenuada (ATR).

#### 4.5.3 Análise Espectroscópica das proteínas formadas *in vitro* por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de *Fourier* / Reflectância Total Atenuada (FTI-R/ATR)

Um dispositivo de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) , operando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) (Vertex 70, Brüker, Billerica, MA, EUA) foi utilizado para análise dos espectros da película formada *in situ* nas diferentes condições estabelecidas para o estudo *in situ*. As amostras de película extraídas com membranas Hybond para ligação de proteínas (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA) foram acondicionadas

previamente às análises em placa de petri, com uso de luvas e pinça. Os espectros obtidos foram analisados a partir do software OriginPro 8.0.

O dispositivo de ATR opera mensurando as mudanças que ocorrem em um total de raios infravermelhos que refletem internamente quando o feixe cônico entra em contato com uma amostra. Um feixe de infra-vermelho é dirigido para um cristal opticamente denso, com um índice de refração elevado a um certo ângulo. Esta reflexão interna cria uma onda evanescente que se estende para além da superfície do cristal na amostra mantida em contato com o cristal. A energia atenuada de cada onda evanescente retorna para o feixe infra-vermelho, que então termina no lado oposto do cristal e passa pelo detector no espectrômetro do infra-vermelho. As curvas geradas pelo dispositivo foram analisadas pelo software Opus 6.5 (Brüker, Billerica, MA, EUA) e OriginPro 8.0 (Massachussets, EUA).

## 5 RESULTADOS

A tabela 3 mostra os valores de pH para as diferentes proporções de suco:saliva. Os resultados mostram que nas proporções de suco:saliva 10:1 e 1:1, onde a quantidade de bebida é maior ou igual a de saliva, os pHs são menores. Quando a quantidade de saliva é superior a das bebidas o pH das amostras começa a elevar-se. O pH inicial do suco reconstituído é maior do que o do suco integral, entretanto, quando as proporções de saliva passam a ser maiores que a das bebidas, observa-se que os pHs para as amostras de suco reconstituído são ligeiramente menores que os do suco integral.

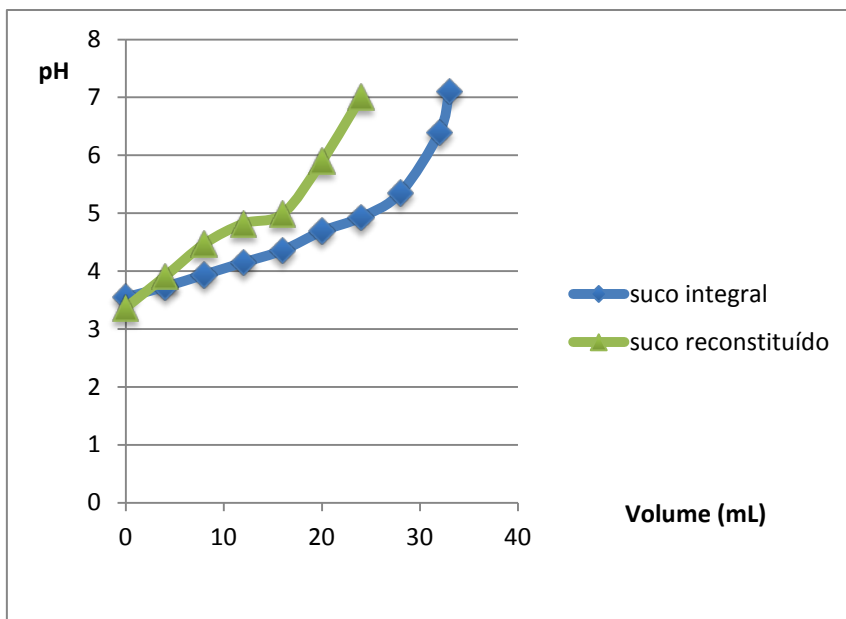
**TABELA 3:** Variação do pH das misturas suco:saliva

AMOSTRAS	Suco Reconstituído pH ( $\pm$ DP)	Suco Integral pH( $\pm$ DP)
Suco	2,90 ( $\pm$ 0,16)	3,42 ( $\pm$ 0,29)
Proporção 10:1	3,01 ( $\pm$ 0,20)	3,35 ( $\pm$ 0,15)
Proporção 1:1	3,70 ( $\pm$ 0,40)	3,65 ( $\pm$ 0,26)
Proporção 1:10	5,79 ( $\pm$ 0,20)	4,90 ( $\pm$ 0,15)
Proporção 1:20	6,67 ( $\pm$ 0,42)	6,04 ( $\pm$ 0,72)
Proporção 1:40	6,94 ( $\pm$ 0,10)	6,55 ( $\pm$ 0,32)
Proporção 1:50	7,03 ( $\pm$ 0,05)	6,84 ( $\pm$ 0,00)
Proporção 1:100	7,29 ( $\pm$ 0,05)	7,06 ( $\pm$ 0,11)
Saliva	7,46 ( $\pm$ 0,17)	7,12 ( $\pm$ 0,41)

Amostras: a proporção corresponde a razão suco:saliva

A medida dos pHs das amostras foi realizada em triplicata, e cada valor expresso corresponde a uma média de pelo menos três medidas independentes. Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão das medidas

A titulação das bebidas foi realizada através da adição gradual de NaOH 0,1 mol/L. Três medidas independentes foram realizadas e a média foi registrada. Enquanto os sucos artificiais precisaram em média de 23,5 mL ( $\pm$ 0,71) de base para atingir pH 7,0, os sucos integrais precisaram de 36 ( $\pm$ 1,41).



**FIGURA 3:** Curva de Titulação das bebidas

A tabela 4 mostra o volume de NaOH 0,1 mol/L utilizado para neutralizar 3 mL das misturas saliva:suco. As amostras que obtiveram pH maior ou igual a 7,0 não foram tituladas. As amostras de suco integral precisaram de maior quantidade de base para serem neutralizadas com relação às de suco reconstituído.

**TABELA 4:** Capacidade de tamponamento das misturas saliva:suco

AMOSTRAS	pH (integral)	Volume 1	pH(reconstituído)	Volume 2
Suco	3,26	4,05	3,05	1,88
Proporção 10:1	3,36	4,05	3,16	1,65
Proporção 1:1	3,57	2,0	4,01	0,85
Proporção 1:10	5,02	0,26	6,41	0,062
Proporção 1:20	7,22	-	7,66	-
Proporção 1:100	7,45	-	7,68	-
Saliva	7,72	-	7,72	-

Amostras: a proporção corresponde a razão suco:saliva

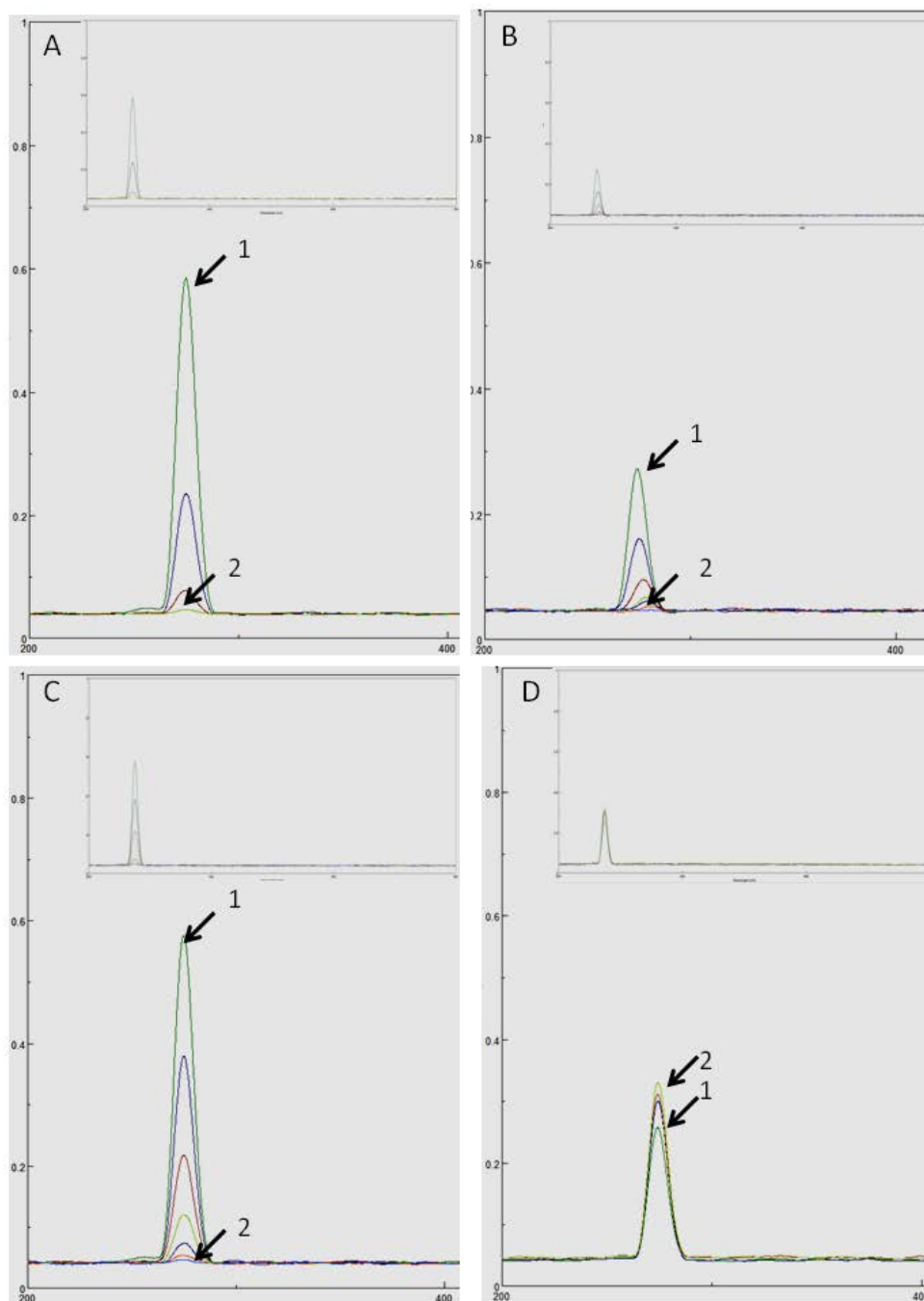
Volume 1: volume em mL de NaOH 0,1 mol/L utilizado para titular as amostras de suco integral; Volume 2: volume em mL de NaOH 0,1 mol/L utilizado para titular as amostras de suco reconstituído.

O efeito da adição das bebidas sobre a saliva foi analisado acompanhando a fluorescência do triptofano (282nm), que é utilizado para verificar desnaturação de proteínas. Os espectros foram realizados com excitação a 282 nm e emissão de 200 a 800 nm. A figura 4 mostra que com a adição de pequenas quantidades dos sucos a emissão em 282 nm diminui de intensidade até desaparecer. Na amostra de suco integral o sinal do triptofano desaparece com a adição de 150  $\mu$ L de suco, enquanto que para o suco reconstituído somente após a adição de 500  $\mu$ L o sinal desaparece. Já para o suco integral diluído para 30% foi necessário adicionar 340 $\mu$ L para o sinal desaparece. O sinal do triptofano não desaparece com a adição de água pois a água pura tem um pico de emissão em aproximadamente 280 nm e este pico aumenta de intensidade pela adição de água.

O quadro 2 mostra a relação dos volumes de bebida adicionados a 3 mL de saliva e o pH para cada situação. Estes resultados mostram que o pH em que a saliva deixa de emitir a 280 nm (desnatura) foi 5,94 para o suco integral 100%; 6,58 para o suco integral 30% e 5,6 para o suco reconstituído. O pH saliva praticamente não sofreu alterações pela adição de água. É interessante notar que diluindo o suco integral para 30%, o conteúdo de ácidos também foi diluído e esperava-se que seria necessário um volume de aproximadamente 500  $\mu$ L para o desaparecimento do sinal a 280 nm, se o efeito fosse somente da diminuição do pH. Além disso, com suco reconstituído o pH de desnaturação das proteínas foi inferior ao do suco integral.

A figura 5 mostram os espectros de fluorescência sincronizado das mistura suco:saliva em diferentes proporções. Os espectros mostram que quando a proporção de suco integral é maior que a de saliva (10:1), o sinal observado para saliva pura é reduzido e deslocado para direita (Figura 5B). Quando a quantidade de saliva passa a ser superior a de suco integral os picos começam a deslocar para esquerda até a proporção de suco integral:saliva de 1:100, cujo espectro apresenta um perfil semelhante a da saliva pura. Na proporção 1:50 de suco integral 30%:saliva, o perfil observado é semelhante a saliva pura (Figura 5D). Os espectros das amostras de suco reconstituído mostram que em maior proporção de suco os espectros deslocam para direita e quando a quantidade de saliva é igual a de suco (1:1), o espectro recupera o

perfil da saliva pura. A água não desloca os espectros para direita, sendo apenas capaz de diminuir o sinal das amostras até a proporção de 1:1.



**FIGURA 4.** . Espectros de emissão de fluorescência (excitação 282 nm) do pool de saliva antes (1) e após a adição das bebidas (2). (A) Saliva: suco integral ((2)=150µL); (B) Saliva: suco reconstituído ((2)=500 µL); (C) Saliva: Suco Integral 30% ((2)=340µL); (D) Saliva: Água Mineral ((2)=200 µL).

**QUADRO 2.** Relação volume de bebida adicionado a saliva e o pH final

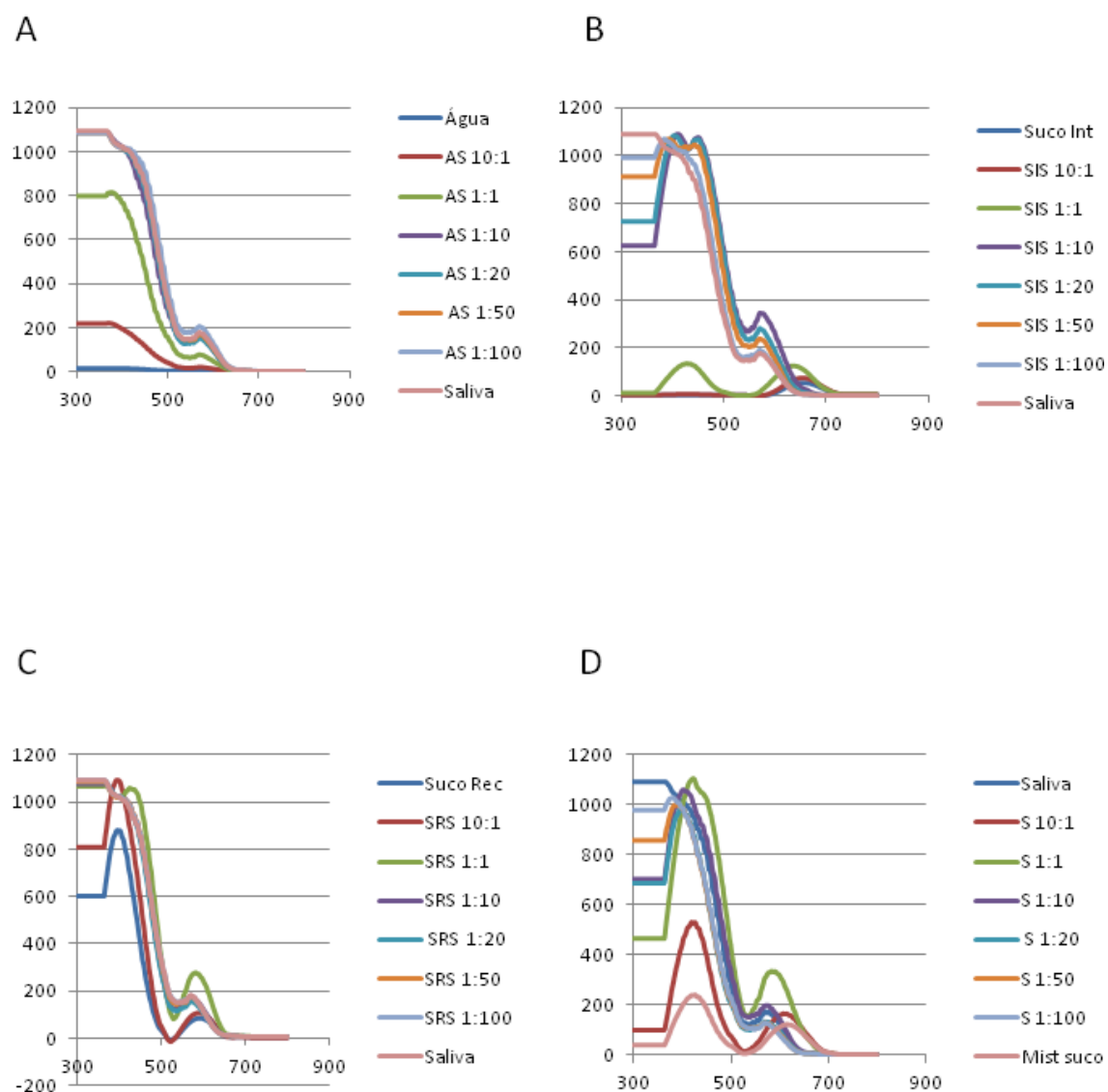
Volume Adicionado de bebida	Suco Integral	Suco Integral 30%	Suco Reconstituído	Água Mineral
Saliva 3 mL	7,41	7,30	7,33	7,60
10 $\mu$ L	7,25	7,27	7,24	7,43
10 $\mu$ L	7,18	7,19	7,19	7,45
10 $\mu$ L	7,04	7,17	7,17	7,42
10 $\mu$ L	6,98	7,16	7,11	7,48
10 $\mu$ L	6,80	7,15	7,08	7,52
10 $\mu$ L	6,71	7,16	7,05	7,51
10 $\mu$ L	6,64	7,01	7,01	7,57
10 $\mu$ L	6,57	6,98	6,97	7,54
10 $\mu$ L	6,49	7,03	6,91	7,59
10 $\mu$ L	6,39	7,01	6,86	7,62
50 $\mu$ L	5,94	6,86	6,67	7,65
50 $\mu$ L	5,55	6,77	6,50	7,68
50 $\mu$ L	4,99	6,67	6,33	7,70
50 $\mu$ L	4,71	6,63	6,17	7,68
50 $\mu$ L	4,51	6,58	5,99	7,70
50 $\mu$ L	4,36	6,50	5,83	7,73
50 $\mu$ L	4,22	6,43	5,70	7,76
50 $\mu$ L	4,13	6,38	5,61	7,77
350 $\mu$ L	---	---	4,49	---
900 $\mu$ L	---	4,55	---	---

O perfil de proteínas solúveis das misturas bebida: saliva foi visualizado por eletroforeses SDS-PAGE e pode ser analisado na figura 6. No total foram realizados três experimentos independentes, que apresentaram perfil semelhante e um dos resultados é apresentado na figura 6. Nas linhas 1 e 2 de cada gel, onde havia maior proporção de bebida era maior ou igual a de saliva observamos perda de proteínas. Nas amostras com suco integral a perda das proteínas foi maior do que nas amostras com suco reconstituído. Nas linhas 1 e 2 também corresponde aos menores valores de pH das amostras.

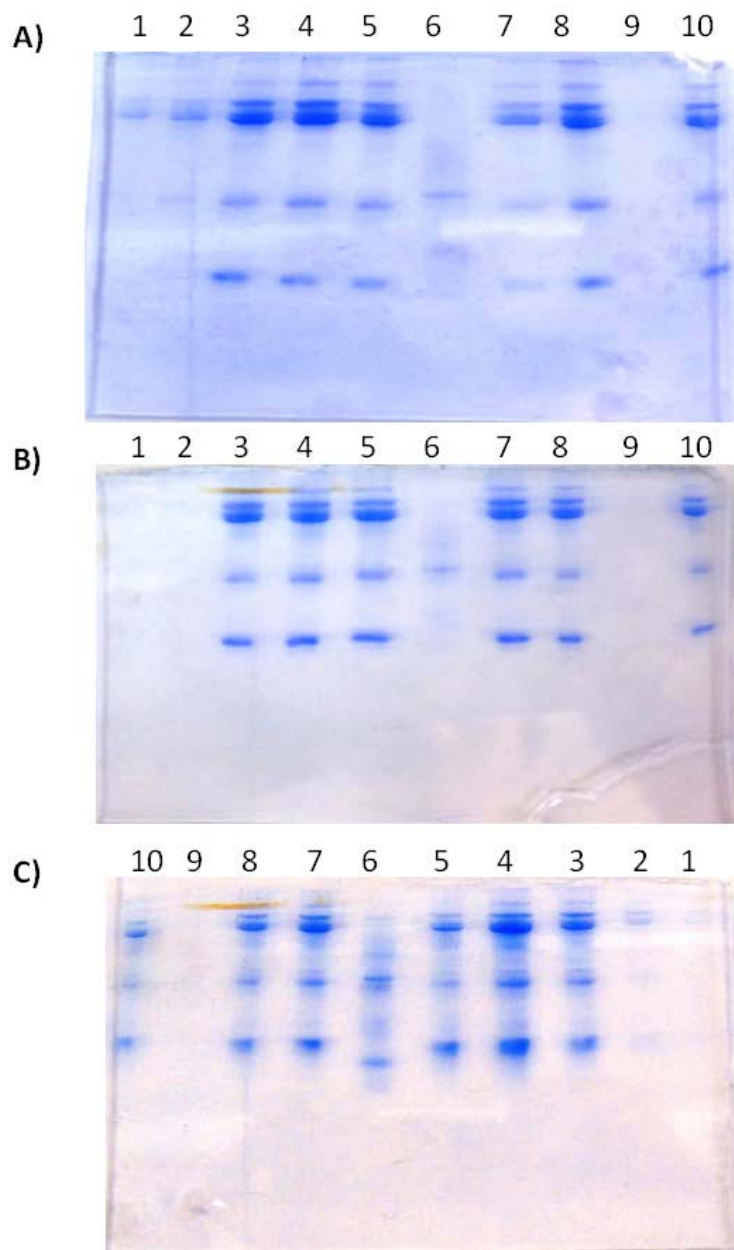
Para verificar o efeito dos sobre sucos sobre a composição da película dental adquirida, a película foi formada *in vitro* em presença das misturas suco:saliva em diferentes proporções. Após a extração das películas sua composição foi analisada por FTIR/ATR. Os resultados mostraram que as PDAE formadas em presença de saliva e suco integral ou reconstituído apresentam um perfil de espectro semelhante ao dos sucos na região dos



comprimentos de onda de 1750 a 1000. Estes resultados mostram que os componentes dos sucos são incorporados a PDAE formada *in vitro* (Figura 7A e B). A película formada em presença de água:saliva mostra um caráter híbrido, com a região de 1700 a 1100 semelhante ao espectro da água e a região de 1100 a 600 semelhante a da saliva. Estes resultados sugerem que a película formada nesta situação é constituída tanto de água como componentes da saliva.

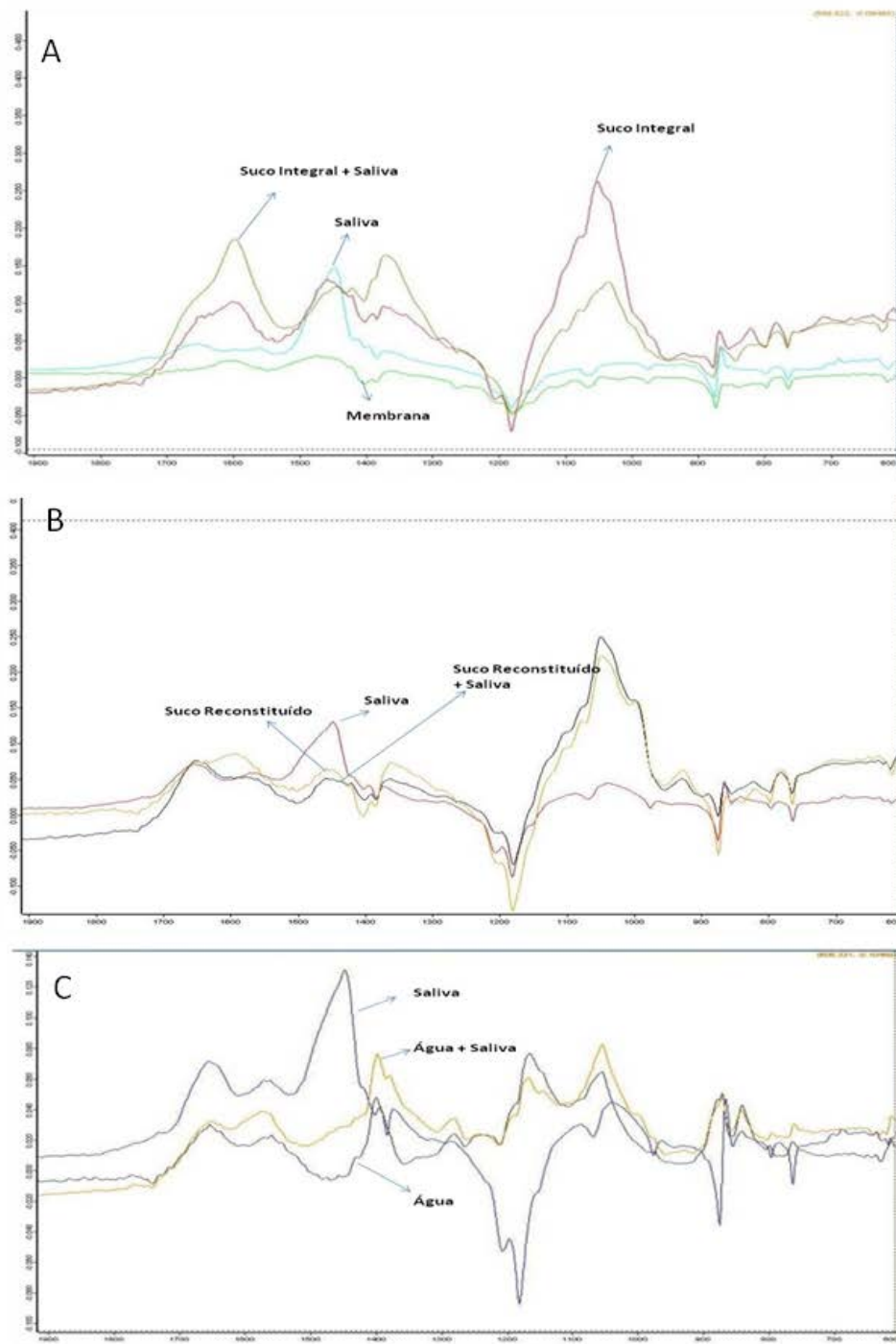


**FIGURA 5.** Espectro de fluorescência sincronizado das misturas água mineral: saliva (A); Suco integral: Saliva (B); Suco Reconstituído: Saliva (C); Suco Integral 30%: Saliva (D)



**FIGURA 6:** Perfil das proteínas solúveis das misturas bebida: saliva em diferentes proporções.

**(A) Mistura água mineral: saliva.** 1 - água: saliva 10:1; 2 - água: saliva 1:1; 3 - água: saliva 1:9; 4 - água: saliva 1:19; 5 - água: saliva 1:39; 6 - Marcador de massa molecular (LMW - GE); 7- água: saliva 1:49; 8 - água: saliva 1:99; 9 - água e 10 - saliva. **(B) Mistura suco integral: saliva.** 1 - suco integral: saliva 10:1; 2 - suco integral:saliva 1:1; 3 - suco integral:saliva 1:9; 4 - suco integral:saliva 1:19; 5 - suco integral:saliva 1:39; 6 - Marcador de massa molecular (LMW - GE); 7- suco integral:saliva 1:49; 8 - suco integral:saliva 1:99; 9 - suco integral e 10 - saliva. **(C) Mistura suco reconstituído: saliva.** 1 - suco reconstituído :saliva 10:1; 2 - suco reconstituído:saliva 1:1; 3 - suco reconstituído:saliva 1:9; 4 - suco reconstituído:saliva 1:19; 5 - suco reconstituído:saliva 1:39; 6 - Marcador de massa molecular (LMW - GE); 7- suco reconstituído:saliva 1:49; 8 - suco reconstituído :saliva 1:99; 9 - suco reconstituído e 10 - saliva.



**FIGURA 6.** Espectros de ATR das amostras (A) Suco Integral: Saliva; (B) Suco Reconstituído: Saliva; (C) Água Mineral: Saliva

## 6 DISCUSSÃO

Variados estudos mostraram através de experimentos *in situ* ou *in vitro* que componentes da dieta provocam alterações na película dental adquirida (HANNIG; BALZ, 1999; VACCA; BOWEN, 2000; WROBLEWSKI *et al.*, 2001; FINKE *et al.*, 2002; HANNIG *et al.*, 2003; HANNIG *et al.*, 2004; PROCTOR *et al.*, 2005; HARA *et al.*, 2006; HANNIG *et al.*, 2008; HANNIG *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2012). Estas alterações na composição da PDAE podem ser oriundas de mudanças na composição e estrutura das proteínas salivares. Assim, neste trabalho foi avaliado o efeito dos sucos reconstituído e integral de uva sobre a estrutura das proteínas salivares e composição da PDAE.

Os sucos foram misturados com a saliva em diferentes proporções para simular a variação na quantidade disponível de sucos na cavidade bucal ao longo do tempo. Maiores quantidades de suco seriam observadas logo após a sua ingestão e com o tempo a capacidade de lavagem da saliva reduziria esta quantidade. Os sucos de uva reconstituído ou integral teriam pelo menos dois efeitos sobre as proteínas salivares e da PDAE: efeito do pH que causaria a desnaturação de proteínas e a interação dos polifenóis presentes no suco com as proteínas salivares que provocam a sua precipitação.

Neste estudo, observamos que na proporção 1:1 suco:saliva, o pH final da mistura foi menor que o pH crítico para a dissolução do esmalte dental (5,5) e que aumentaria o risco a erosão dental. A variação estrutural das proteínas salivares nas diferentes proporção suco:saliva foi analisada por fluorescência. Nos espectros sincronizados, em baixos pH os picos de emissão de fluorescência deslocam para comprimentos de ondas superiores a 400 nm, sugerindo que as proteínas presentes estão sofrendo desnaturação. Esta desnaturação poderia interferir na composição da película dental adquirida para diminuição da adsorção de proteínas salivares a película ou pela dessorção das proteínas da película. Hannig e Balz (1999), mostraram que a presença de

película formada *in vivo* preveniu a completa dissolução de os cristais de hidroxiapatita dos blocos de esmalte. Em contraste à completa dissolução desses cristais ocorreu após curto tempo de exposição à solução de ácido cítrico 0,1% em espécimes sem película. Além disso, a diminuição 0,1%, na concentração das proteínas da saliva pode alterar a capacidade de tamponamento de uma solução (LAMANDA *et al.*, 2007). As variações de pH que acometem a cavidade bucal geram diferentes perfis proteicos, que por sua vez, podem estar relacionados à diferenças na dieta (LAMY *et al.*, 2010). Assim, as alterações no perfil proteico salivar podem alterar a capacidade tampão da saliva e composição da película dental adquirida, aumentando a susceptibilidade a erosão e cárie dental.

Os espectros de emissão com comprimento de excitação fixo em 282 nm foram realizados e os sucos e água foram adicionados a saliva para verificar o volume da bebida necessário para causar a desnaturação completa e/ou mudanças conformacionais das proteínas salivares. Os resultados mostram que quando o suco integral está diluído com a saliva em uma proporção 1:20 (suco:saliva) ainda exerce efeito desnaturante e/ou cause mudanças conformacionais sobre as proteínas salivares, enquanto que no suco reconstituído, o efeito máximo foi observado na proporção de 1:6, sugerindo que são necessárias menores quantidades de suco integral para causar a desnaturação e/ou mudanças conformacionais. A desnaturação de proteínas, altera a solubilidade das proteínas causando sua precipitação. Este efeito foi avaliado pela análise do perfil de proteínas solúveis das misturas suco:saliva por SDS-PAGE. Quando as proporções de suco foram maiores ou iguais a de saliva praticamente não foram observadas proteínas nas mistura suco integral: saliva e quantidades reduzidas foram observadas para o suco reconstituído. Rinaldi *et al.* (2012) observaram redução da precipitação de proteínas salivares com o aumento do pH. Como os pH das misturas suco:saliva nas diferentes proporções são próximos nos experimentos realizados com suco integral e reconstituído, as diferenças no perfil de precipitação e dos espectros de fluorescência sugerem que outro fator, além do ácido que reduziria o pH, possa estar contribuindo para a precipitação das proteínas. Com a adição de água a saliva a intensidade dos picos a 280 nm aumentam. Souza Sierra *et al.* (1996)

mostraram que os espectros de emissão de amostras de água apresentam picos na região de 230 a 300 nm, o que contribuiu para o aumento do sinal observado nos espectros de emissão com excitação a 282 nm. Embora, a água apresente este perfil, estes espectros mostram que os resultados observados pela adição de sucos a saliva parecem não ser resultados de alteração de força iônica do meio.

As uvas estão entre as frutas mais consumidas do mundo, e são importante fonte de componentes fenólicos essenciais para a saúde humana. A variedade de uva do suco integral utilizada neste estudo foi a *Vitis lambrusca*, variedade Bordo (LAGO-VANZELA *et al.*, 2011). Os componentes mais abundantes das uvas são carboidratos, ácidos orgânicos e polifenóis. Os taninos são polifenóis derivados de plantas e tem a capacidade de precipitar certas proteínas salivares, causando uma sensação de adstringência na cavidade oral (WROBLEWSKI *et al.*, 2001; PAPADOPOLOU; FRAZIER, 2004; HARA *et al.*, 2012). Os taninos interagem com as proteínas ricas em prolina na saliva modificando a viscosidade e capacidade de lubrificação da saliva na cavidade oral (SOARES *et al.*, 2011; KÓSCIELNIAK *et al.*, 2012).

Como o suco integral é rico em polifenóis, a presença destas substâncias pode ter influenciado na diferença do perfil de proteínas solúveis e espectro de fluorescência das misturas suco:saliva do suco integral e reconstituído. A presença dos polifenóis poderia contribuir para alterações no perfil proteico da saliva e da composição da película dental adquirida. Os efeitos dos polifenóis foram investigados por diversos autores (WROBLEWSKI *et al.*, 2001; BENNICK, 2002; PROCTOR *et al.*, 2005; HANNIG *et al.*, 2008; FERRAZZANO *et al.*, 2009; HARA *et al.*, 2012; GINSBURG *et al.*, 2013). A maioria dos autores destacou a propriedade das taninas, como polifenóis, em precipitar proteínas da saliva. Hara *et al.*, (2012) observaram que os polifenóis de chás eram responsáveis por precipitar proteínas da saliva, incluindo a  $\alpha$ -amilase. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes (BERGMANN, 1995; LU, 1998). Hannig e colaboradores (2008), que avaliou a influência do chá de *Cistus*, bebida rica em polifenólica na colonização bacteriana e atividade enzimática *in situ*. Os resultados mostram que a bebida, reduziu a aderência de bactérias na película, e a atividade da peroxidase. Os

polifenóis do cacau, café e chá podem ter papel na prevenção de moléstias orais, por reduzir a formação de biofilme e formação de ácido por *S. mutans* e *S. sanguinis* (HANNIG *et al.*, 2008) Estudos *in vitro* e *in situ*, com ácido cítrico e ácido clorídrico, não mostraram alterações na película dental adquirida desencadeadas pelos componentes da dieta testados (NEKRASHEVYCH *et al.*, 2003; NEKRASHEVYCH *et al.*, 2004 HANNIG *et al.*, 2007).

Nos experimentos de precipitação de proteínas insolúveis também observamos que em presença de água mineral pH 7 nas proporções água:saliva 10:1 e 1:1, a quantidade de proteína solúveis diminuiu. Os espectros de fluorescência sincronizados da mistura saliva:água mostram que quando a proporção de água é igual o superior a da saliva. A emissão da saliva diminui de intensidade, sugerindo desnaturação e/ou mudanças conformacionais. Assim, provavelmente a redução da força iônica da saliva pela adição de água pode ter causado diminuição da solubilidade das proteínas

Os espectros de ATR mostram que os sucos de uva tem alto conteúdo de polifenóis, cujos espectros se sobrepõem às regiões das proteínas salivares. Khaustova *et al.* (2010) analisou amostras de saliva por ATR e Derenne *et al.* (2013) polifenóis, os espectros obtidos por ambos autores são sobreponíveis. Tanto as proteínas salivares como os polifenóis apresentam picos nas regiões de 3600 a 2500 e 1750 a 1000 em ATR. Assim, é difícil assinalar picos específicos para proteínas salivares e polifenóis nas amostras de PDAE formadas neste estudo. Entretanto, fica claro pela comparação dos espectros de ATR que PDAE formada em presença de suco:saliva apresenta espectro semelhante a da PDAE formada em presença de suco. As PDAE formadas em presença dos sucos apresentaram picos na região característica de polifenóis, que também são observados nas PDAE formadas em presença de suco: saliva. Estes resultados sugerem que estas moléculas estão adsorvendo a superfície do esmalte. Os efeitos dos polifenóis na composição e atividade da PDAE tem sido descritos na literatura. JOINER *et al.* (2003, 2004, 2006) mostraram que os polifenóis purificados de chá preto (epicatecina-3-gallato (ECG), epigallocatecina- 3-gallato (EGCG) e teaflavina) e componentes do vinho tinto adsorvem fortemente a película formada *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita e aumentaram a adsorção de proteínas salivares. Proctor *et al.*,

(2005) observaram *in vitro* que a ligação do pequeno polifenol, epigallocatequina a hidroxiapatita não foi afetada pela presença de saliva ou película mesmo quando proteínas e este polifenol foram adicionados simultaneamente. Entretanto, a quantidade de película cobrindo a hidroxiapatita aumentou com adição de antocianina, um polifenol derivado da casca da uva e o maior polifenol do chá preto. Segundo os autores as diferenças observadas no perfil de ligação esta relacionada as diferenças estruturais dos polifenóis, já que epigallocatequina é pequena e neutra e a antocianina é pequena e carregada e os outros polifenóis do chá são mais polares. O *Cistus*, um chá rico em polifenóis também interfere na atividade da película e a formação de biofilme *in situ* (HANNIG *et al.*, 2008). A película dental adquirida formada *in vitro* com polifenóis por Joiner *et al.* (2004), a partir de um *pool* de saliva mostrou que os polifenóis adsorvem à película.

Bebidas como chá, café, vinho tinto e outros alimentos ricos em polifenóis são responsáveis por pigmentar a superfície dentária. A ocorrência disso pode estar ligada ao fato de histatinas de baixo peso molecular e outras proteínas salivares terem capacidade de se ligar a polifenóis dentária. (PROCTOR *et al.*, 2005)

Além disso, neste estudo os sucos reconstituído e integral foram titulados com NaOH. O suco integral de uva, sem adição de água, sacarose ou conservantes, apesar de pH inicial levemente mais básico em relação ao reconstituído, necessitou de maior quantidade de base para ser neutralizado. O mesmo foi observado para as misturas suco :saliva com suco integral. Estes resultados sugerem que o suco integral pode apresentar uma acidez maior que o suco reconstituído. Os sucos integrais de uva em geral apresentam ácido cítrico ( $pK_{a1}=3.15$ ,  $pK_{a2}=4.77$ ,  $pK_{a3}=6.40$ ), ácido málico ( $pK_{a1} = 3.4$ ,  $pK_{a2} = 5.13$ ) e ácido tartárico ( $pK_{a1}=3.03$ ) (EMBRAPA, 1998) e as informações encontradas no rótulo do suco de uva Del Valle apenas menciona que este suco contém ácido cítrico. Assim, o suco integral teria uma maior capacidade tampão por conter diferentes ácidos.

Como os sucos de uva apresentam baixo pH a maior preocupação quanto ao seu consumo seria o desenvolvimento de erosão dental e cárie



dental devido a presença de açúcar. Entretanto, estudos com *Galla chinensis* uma planta medicinal chinesa, rica em polifenóis, mostram que o extrato desta planta é capaz de inibir a desmineralização e estimular a remineralização de lesões cárie de esmalte e dentina radicular (CHU *et al.* 2007; LIAN-HUANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2008). O ácido gálico é um dos componentes fenólicos desta planta que parece ser o responsável pela redução da desmineralização (LIAN-HUANG *et al.*, 2012). O efeito protetor sobre os dentes pode estar relacionado à capacidade dos taninos em formar complexos insolúveis com o cálcio (CALIXTO; NICOLAU, 1986).

Embora, o presente estudo não tenha verificado o efeito dos sucos sobre a des e remineralização do esmalte ou dentina, o efeito observado de desnaturação e precipitação de proteínas da saliva e alteração da composição da película, aliados ao baixo pH destas bebidas podem conduzir a conclusão que estes sucos poderiam danificar os tecidos dentais. Entretanto, dada a complexidade da composição dos sucos e a presença de polifenóis, são necessários mais estudos para compreender o papel destes sucos na etiologia ou proteção dos tecidos dentais em relação à cárie e erosão.

## CONCLUSÕES

Os resultados mostram que:

- Os sucos integral e reconstituído de uva são capazes de causar desnaturação e/ ou mudanças conformacionais das proteínas salivares
- Componentes do suco de uva, provavelmente os polifenóis são incorporados à película dental adquirida do esmalte.
- Os resultados sugerem que componentes do suco de uva integral apresentam um efeito maior na conformação das proteínas salivares quando comparado ao suco reconstituído

## REFERÊNCIAS

- AL-HASHIMI, I., LEVINE, M.J. Characterization of in vivo salivary derived enamel pellicle. **Arch Oral Biol.** v.34 p. 289-295. 1989.
- AL MAJED, I.; MAGUIRE, A.; MURRAY, J.J. Risk factors for dental erosion in 5-6 year old and 12-14 year old boys in Saudi Arabia. **Comm Dent Oral Epidemiol.**
- AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M.; MILOSEVIC, A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. **J Dent Res.** v. 78., n.12, p. 1821-1828.
- ARAUJO, C.L., MELO, E.I. COELHO, N.M.M. Potentiometric detection of citrates in beverages using a graphite carbon electrode. **Talanta.** v. 84, p.1169-1173. 2011.
- BEHRENDT, A., OBERSTE, V., WETZEL, W.E. Fluoride concentration and pH of Iced Tea Products. **Caries Res.** v. 36, p. 405-410. 2002.
- BUZALAF, M.A.R., BASTOS, J.R., GRANJEIRO, J.M., LEVY, F.M., TENOVUO, J., GRAHN, E., LEHTONEN, O-P., HYYPPÄ, T., KARHUVAARA, L., VILJA, P. Antimicrobial factors in saliva: ontogeny and relation to oral health. **J Den Res.** v. 66, p. 475-479. 1987.
- BUZALAF, M.A.R.; HANNAS, A.R.; KATO, M.T. Saliva and dental erosion. **J Appl Oral Sci.** v.20, p. 493-520. 2012.
- BENNICK, A.; YAN, Q. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. **J Biochem.** v. 311 p. 341-347, 1995.
- BORGES, A.B.; SCARMUCCI, T.; LIPPERT, F.; ZERO, D.T.; HARA, A.T. Erosion protection by calcium lactate / sodium fluoride rinses under different salivary flows in vitro. **Caries Res.** v. 48. n.3. p. 193-199. 2014.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 7. p.248-254. 1976.
- CALIXTO, J.; NICOLAU, M.; RAE, G. Pharmacological actions of tannic acid and I. Effects on isolated smooth and cardiac muscles and on blood pressure. **Planta Medica.** v. 32. p. 32-35. 1986.
- CARDOSO, V.E.S.; RODRIGUES, M.H.C. Fluoride content of several brands of teas and juices found in Brazil and risk of dental fluorosis. **Rev Fac Odontol Bauru.** v.10, p. 263-277. 2002.
- CASTAGNOLA, M.; PICCIOTTI, P.M.; MESSANA, I.; FANALI, C.; FIORITA, A.; CABRAS, T.; CALÒ, L.; PISANO, E.; PASSALI, G.C.; IAVARONE, F.; PALUDETTI, G.; SCARANO, E. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. **Acta Otorhinolaryngol Ital.** v. 31, p.347-367. 2011.

CATTEAU, C.; TRENTSAUX, T.; DELFOSSE, C.; ROUSSET, M.M. Impact des jus de fruits et des boissons fruitées sur la santé de l'enfant et de l'adolescent: le point de vue du chirurgien dentiste. **Arch Pédiatrie**. v. 19. n. 2. p. 118-124. 2012.

CHENG, L.; EXTERKATE, R.A.; ZHOU, X.; LI, J.; TEN CATE, J.M. Effect of *Galla Chinensis* on growth and metabolism of microcosm biofilms. **Caries Res**. v. 45, p. 87-92. 2011.

DAWES, C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. **J Physiol**. v. 220. p. 529-545. 1972

DERENNE, A.; VAN HEMELRYCK, V.; LAMORAL-THEYS, D.; KISS, R.; GOORMAGHTIGH, E. FTIR Spectroscopy: a new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells. **Bioch Biophys Acta**. v. 1832. p. 46-56. 2013.

DEZAN, C.C.; NICOLAU, J.; SOUZA, D.N.; WALTER, L.R. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. **Arch Oral Biol**. v. v. 47, p. 423-427. 2002.

Di GIULIO, M.; Di BARTOLOMEO, S.; Di CAMPLI, E.; SANCILIO, S.; MARSICH, E.; TRAVAN, A.; CATALDI, A.; CELLINI, L. The effect of a silver nanoparticle polysaccharide system on streptococcal and saliva-derived biofilms. **Int J Mol Sci**. v.14, p.13615-13627. 2013.

DUARTE, S.; GREGOIRE, S.; SINGH, A.P.; VORSA, N.; SCHAICH, K.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiol Lett**. v.257. p.50-56. 2006.

EGGEN, K.H.; ROLLA, G. Gel filtration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour pellicle). **Scand J Dent Res**. v. 90, 182-188. 1982.

EGGEN, K.H.; ROLLA, G. Further studies on the composition of acquired enamel pellicle. **Scand J Dent Res**. 1983.

EMBRAPA. Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola. Fevereiro de 1998, ISSN 0102-3969.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C.H. Oral biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. **J Dent Res**., v. 89, p. 8–18. 2010.

FINKE, M.; PARKER, D.M.; JANDT, K.D. Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel. **J Colloid Interf Sci**. v. 251. p. 263-270. 2002.

FULEKI, T.; PELAYO, E.; PALABAY, R. Carboxylic acid composition of authentic varietal and commercial grape juices. **J AOAC Int**. v. 76, p. 591-600. 1993.

FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; NATALE, A.; POLLIO, A. Anti cariogenic effects of polyphenols from stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). **Fitoterapia**. v. 80, p.255-262. 2009.

FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; ZARRELLI, A.; PINTO, G.; POLLIO, A. Plant polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A review. **Molecules**. v.16, p.1486-1507. 2011.

GAMBUTI, A.; RINALDI, A.; PESSINA, R.; MOIO, L. Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol adstringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after binding reaction. **Food Chem**. v. 97, p. 614-620. 2006

GINSBURG, I.; KOHEN,R.; KOREN, E. Saliva: a 'solubilizer' of lipophilic antioxidant polyphenols. **Oral Dis**. v. 19, p. 321-322. 2013.

GOLLÜCKE, A.B. Recent Applications of Grape Polyphenols in Foods, Beverages and Supplements. **Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 2, p.105-109. 2010.

GONÇALVES, G.K.M.; GUGLIELMI, C.A.B.; CORRÊA, F.N.P.; RAGGIO, D.P.; CORRÊA, M.S.N.P. Erosive potential of different types of grape juices. **Braz Oral Res**. v. 26, n.5, 2012.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J Biol Chem**. v.256 p. 4494-4497, 1981.

HANNIG, C.; ATTIN, T.; HANNIG, M.; HENZE, E.; BRINKMANN, K.; ZECH, R. Immobilisation and activity of human  $\alpha$ -amilase in the acquired enamel pellicle. **Arch Oral Biol**. v. 49. p.469-475. 2004.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monogr Oral Sci**. v.19, p.29-64, 2006.

HANNIG,C.; BECKER, K.; HAUSLER, N.; HOTH-HANNIG, W.; ATTIN, T.; HANNIG, M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion—an ex vivo pilot study. **Arch Oral Biol**. v. 57 p. 444–449. 2007.

HANNIG, C.; BERNDT, D.; HOTH-HANNIG, W.; HANNIG, M. The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle – an *in situ* study. **Arch Oral Biol**. v. 54. p. 518-526. 2009.

HANNIG, M.; BALZ,M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. **Caries Res**. v. 35, p. 142–148. 2001.

HANNIG, M.; BALZ,M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. **Caries Res**. v. 33. p. 372–379. 1999.

HANNIG, M.; HESS N.J.; HOTH-HANNIG, W.; De VRESE, M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralisation—an in situ pilot study. **Clin Oral Investig**. v. 7 p. 158–161. 2003.

HANNIG, C.; KIRSCH, J.; AL-AHMAD, A.; KENSCH, A.; HANNIG, M.; KÜMMERER, K. Do edible oils reduce bacterial colonization of enamel in situ? **Clin Oral Invest**. v. 17. n.2. p. 649-658. 2013.

HANNIG, C.; SPITZMÜLLER, B.; AL-AHMAD, A.; HANNIG, M. Effects of *cistus-tea* on bacterial colonization and enzyme activities of the *in situ* pellicle. **J Dent.** v. 36. p. 540-545. 2008.

HANNIG, C.; SPITZMÜLLER, B.; HOTH-HANNIG, W.; HANNIG, M. Targeted immobilization of lysozyme in the enamel pellicle from different solutions. **Clin Oral Invest.** v. 15. p. 65-73. 2011.

HANNIG, C.; WAGENSCHWANZ, C.; PÖTSCHKE, S.; KÜMMERER, K.; KENSCHKE, A.; HOTH-HANNIG, W.; HANNIG, M. Effect of safflower oil on the protective properties of the *in situ* formed salivary pellicle. **Caries Res.** v. 46. p. 496-506. 2012.

HARALDSSON, G.; HOLBROOK W.P.; KÖNÖNEN, E. Clonal persistence of oral *Fusobacterium nucleatum* in infancy. **J Dent Res** v. 83, p. 500-504. 2004.

HAY, D.I. The interaction of human salivary proteins with hydroxyapatite. **Arch Oral Biol.** v. 18, p. 1517-1529. 1973.

HARA, A.T., ZERO, D.T. The caries environment: Saliva, pellicle, diet and hard tissue ultrastructure. **Dental Clin N Am.** v. 54, p.455-467. 2010.

HARDT, M., THOMAS, L.R., DIXON, S.E., NEWPORT, G., AGABIAN, N., PRAKOBPHOL, A. *et al.* Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC and mass-spectrometry. **Biochem.** v. 44. p. 2885-2899. 2005.

HATTON, M.N., LOOMIS, R.E., LEVINE, M.J., TABAK, L.A. Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. **Biochem J.** v. 393 p. 817-820. 1985.

HELMERHORST, E.J., OPPENHEIM, F.G. Saliva: a dynamic proteome. **J Den Res.** v. 86, p. 680-693. 2007.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **Br J Nutr.** v.98, p. 727-735. 2007.

HUANG, X-L.; LIU, M-D.; LI, J-Y.; ZHOU,X-D.; TEN-CATE, J.M. Chemical composition of *Galla chinensis* extract and the effect of its main component(s) on the prevention of enamel demineralization *in vitro*. **Int J Oral Sci.** v. 4, p. 146-151. 2012.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow and function. **J Prosth Dent.** v. 85. p. 162-169. 2001.

JAGER, D.J.H., VISSINIK, A., TIMMER, C.J., BRONKHORST, E., VIEIRA, A.M., HUYSMANS, M.C.D.N.J.M. Reduction of erosion by protein-containing toothpastes. **Caries Res.** v.47, p.135-140. 2013.

JOINER, A.; MULLER, D.; ELOFSSON, U.M.; ARNEBRANT, T. Adsorption from black tea and red wine onto *in vitro* salivary pellicles studied by ellipsometry. **Eur J Oral Sci.** v. 111. p. 417-422. 2003.

JOINER, A.; MULLER, D.; ELOFSSON, U.M.; ARNEBRANT, T.; Ellipsometry analysis of the *in vitro* adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. **Eur J Oral Sci.** v. 112. n. 6. p. 510-515. 2004.

JOINER, A.; ELOFSSON, U.M.; ARNEBRANT, T. Adsorption of chlorhexidine and black tea onto *in vitro* salivary pellicles, as studied by ellipsometry. **Eur J Oral Sci.** v. 114. p. 337-342. 2006.

KANELIS, A.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Grape. In: G. B. Seymour, J. E. Taylor, & G. A. Tucker (Eds.), **Biochemistry of fruit ripening** (pp. 189–220). London: Chapman & Hall. 1993.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sci.** v.81, 519-533, 2007.

KHAUSTOVA, S.; SHKURNIKOV, M.; TONEVITSKY, E.; ARTYUSHENKO, V.; TONEVITSKY, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst.** v. 135. p. 3183-3192. 2010.

KOLENBRANDER, P.E. Multispecies communities: Interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. **Int. J. Oral Sci.**, v. 3, 49–54. 2011

KOO, H.; DUARTE, S.; MURATA, R.M.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; WATSON, G.E.; SINGH, A.P.; VORSA, N. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on Saliva Coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. **Caries Res.** v. 44, p. 116-126. 2010.

KOŚCIELNIAK, D.; JURCZAK, A.; ZYGMUNT, A.; KRZYŚCIAK, W. Salivary proteins in health and disease. **Acta Biochim Pol.** v.59, n.4,451-7. 2012.

LAGO-VANZELA, E.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the edible parts (Flesh and skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **J Agric Food Chem.** v. 59. p. 13136-13146. 2011.

LAMY, E.; GRAÇA, G.; COSTA, G.; FRANCO, C.; SILVA, F.C.; BAPTISTA, E.S.; COELHO, A.V. Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. **Proteome Sci.** v. 8, [epub]. 2010.

LEE, Y.H.; ZIMMERMAN, J.N.; CUSTODIO, W.; XIAO, Y.; BASIRI, T.; HATIBOVIC-KOFMAN, S.; SIQUEIRA, W.L. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during *in vivo* formation. **PLoS One.** v.8, n.7., e67919. 2013.

LEE, C.A., ISMAIL, B., VICKERS, Z.M. The role of salivary proteins in the mechanism of adstringency. **J Food Sci.**, 77(4), p. C381-C387. 2012.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F.G. Saliva and dental pellicle-A review. **Adv Dent Res.**v.14, p.22-28, 2000.

LEVINE, M.J.; REDDY, M.S.; TABAK, L.A.; LOOMIS, R.E.; BERGEY, E.J.; JONES, P.C. *et al.* Structural aspects of salivary glycoproteins. **J Dent Res.** v. 66 p. 436-441. 1987.

LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS, C. Dental erosion – na overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res.** v. 45, p. 2-12. 2011.

MAGALHÃES, A.C.; MORAES, S.M.; RIOS, D.; WIEGAND, A.; BUZALAF, M.A. The erosive potential of 1% citric acid supplemented by different minerals: an *in vitro* study. **Oral Health Prev Dent.** v. 8. n.1. 2010.

MANDEL, I.D. The functions of Saliva. **J Dent Res.** p. 623-7. 1987.

MARSH, P.D., MOTER, A., DEVINE, D.A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontol 2000.** v.55, p.16-35. 2011.

MARTINS, C.; CASTRO, G.F.; SIQUEIRA, M.F.; XIAO, Y.; YAMAGUTI, P.M.; SIQUEIRA, W.L. Effect of dialyzed saliva on human enamel demineralization. **Caries Res.** v. 47, p. 56-62. 2013

MAYHALL, C.W. Studies on the composition of the acquired enamel pellicle. **Ala J Med Sci.** n. 12, 252-271. 1975.

MILLER, C.S.; FOLEY, J.D.; BAILEY, A.L. *et al.* Current development in salivary diagnostics. **Biomark Med.** v. 4, p. 171-189. 2010.

MORZEL, M.; CHABANET, C.; SCHWARTZ, C.; LUCCHI, G.; DUCOROY, P.; NICKLAUS, S. Salivary protein profiles are linked to bitter taste acceptance in infants. **Eur J Pediatr.** Nov. 19 [Epub ahead of print]. 2013.

NIEUW AMEROGEN, A.; BOLSCHER, J.G.M.; VEERMAN, E.C.I. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? **Caries Res.** v. 38. p. 247-253. 2004.

OKUNSERI, C.; OKUNSERI, E.; GONZALEZ, C.; VISOTCKY, A.; SZABO, A. Erosive Tooth Wear and Consumption of Beverages among Children in the United States. **Caries Res.** v. 45, p. 130-135. 2011.

OPPENHEIM, F.G.; SALIH, E.; SIQUEIRA, W.L.; ZHANG, W.; HELMERHORST, E.J. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1098. p. 22-50. 2007.

PAPANDREOU, D.; ANDREOU, E.; HERACLIDES, A.; ROUSSO, I. Is beverage intake related to overweight and obesity in school children? **Hippokratia.** v. 17. n. 1. p. 42-46. 2013.

PERINPANAYAGAM, H.E.R.; Van WUYCKHUYSE, B.C.; JI, Z.S.; TABAK, L.A. Characterization of low-molecular-weight peptides in human parotid saliva. **J Dent Res.** v. 74. n.1.345-350.1995.

PETTI, S.; SCULLY, S. Polyphenols, oral health and disease: A review. **J Dent.** v. 37. p. 413-423. 2009.



- PROCTOR, G.B.; PRAMANIK, R.; CARPENTER, G.H.; REES, G.D. Salivary Proteins Interact with Dietary Constituents to Modulate Tooth Staining. **J Dent Res.** v.84. n.1. p.73-78, 2005.
- PINHEIRO, E.S.; COSTA, J.M.C.; CLEMENTE, E.; MACHADO, P.H.S.; MAIA, G.A. Estabilidade físico-química e mineral do suco de uva obtido por extração a vapor. **Rev. Cienc. Agron.** v. 40. p. 373-380. 2009.
- RINALDI, A.; GAMBUTI, A.; MOIO, L. Precipitation of salivary proteins after the interaction with wine: the effect of ethanol, pH, fructose and Mannoproteins. **J Food Sci**, v. 77 n.4. 2012.
- RIZZON, L.A.; MIELE, A. Características analíticas de sucos de uva elaborados no Rio Grande do Sul. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 29, p. 129-133. 1995.
- ROMERO, E. G.; MUÑOZ, G. S. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high performance liquid chromatography. **J Chromatography A.** v. 655, p. 111–117. 1993.
- RUHL, S.; RAYMENT, S.A.; SCHMALZ, G.; HILLER, K.-A.; TROXLER, R.F. Proteins in Whole Saliva during the first year of infancy. **J Dent Res.** v.84. p. 29-34. 2005.
- RUPP, F.; HAUPT, M.; EICHLER, M.; DOERIG, C.; KLOSTERMANN, H.; SCHEIDELER, L.; LACHMANN, S.; OEHR, C.; WENDEL, H.P.; DECKER, E.; GEIS-GERSTOFER, J.; von OHLE, C. Formation and photocatalytic decomposition of a pellicle on anastase surfaces. **J Dent Res.** v. 91. n. 1. p.104-109. 2012.
- RYKKE, M.; SONJU, T., ROLLA, G. Interindividual and longitudinal studies of aminoacid composition of pellicle collected *in vivo*. **Scad J Dent Res.** v. 98, 129-134. 1990.
- SÁNCHEZ, G.A. e PRELIASCO, M.V.F. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. **Int J Paed Dent.** v.13, p. 251-257. 2003.
- SANTANA, M.T.A.; SIQUEIRA, H.H.; REIS, K.C.; LIMA, L.C.O.; SILVA, R.J.L. Caracterização de diferentes marcas de suco de uva comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciênc. Agrotec.** v. 32, p. 882-886. 2008.
- SCHENKELS, L.C.P.M.; VEERMAN, E.C.I.; NIEW AMERONGEN, A.V. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 6, p. 161-175. 1995.
- SCHMID, F.X. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In: CREIGHTON, T.E. **Protein Structure – A practical Approach.** 2<sup>nd</sup> Edition. IRL Press, 1998.
- SCHÜPBACH, P.; OPPENHEIM, F.G.; LENDENMANN, U.; LAMKIN, M.S.; YAO, Y.; GUGGENHEIM, B. Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin and histatins in acquired enamel pellicles *in vitro*. **Eur J Oral Sci.**;109(1):60-8,2001

SCHUPBACH, P.; OPPENHEIM F.G.; LENDENMANN, U.; LAMKIN, M.S.; YAO, Y., *et al.* Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin and histatins in acquired enamel pellicles *in vitro*. **Eur J Oral Sci.** n.109, 60-68. 2001.

SEVENHUYSEN,G.P.; HOLODINSKY, C.; DAWES, C. Development o salivary  $\alpha$ -amilase in infants from birth to 5 months. *Am J Clin Nutr.* v. 84, p. 584- 588. 1984.

SIQUEIRA, W.L.; CUSTÓDIO, W.; McDONALD, E.E. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. **J Dent Res.** 2012;91(12):1110-1118.

SIQUEIRA, W.L.; ZHANG, W.; HELMERHORST, E.J.; GYGI, S.P.; OPPENHEIM, F.G. Identification of Protein Components *in vivo* Human Acquired Enamel Pellicle Using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Proteome Research.** v.6, p.2152-2160, 2007.

SIQUEIRA, W.L.; BAKKAL, M.; XIAO, Y.; SUTTON, J.N.; MENDES, F.M. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. **PloS One.** v.7, p. e42204. 2012.

SCHWARTZ, B.; HOFMANN, T. Is there a direct relationship between oral adstringency and human salivary protein binding? **Eur Food Res Technol.** v. 227, p. 1693-1698. 2008.

SCHIPPER, R.G.; SILETTI, E.; VINGERHOEDS, M.H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Arch Oral Biol.** v. 52, p. 1114-1135. 2007.

SHI, B.; DI, Y. Plant polyphenol. **Beijing: Science Press.** 1-76. 2000.

SOARES, S.; VITORINO, R.; OSÓRIO, H.; FERNANDES, A.; VENÂNCIO, A.; MATEUS, N.; AMADO, F.; FREITAS, V. Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. **J Agric Food Chem.** v. 59, p. 5535-5547. 2011.

SIERRA SOUZA, M.M.; GIOVANELA, M. A utilização da espectros de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. **Quím Nova.** v. 19. n. 3. 1996.

SOYER, Y., KOCA, N.,KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. **J Food Comp Anal.** v. 26. p. 629-636. 2003.

TANG, C.; FANG, M.; LIU,R.; DOU, Q.; CHAI, Z.; XIAO, Y.; CHEN, J. The role of grape seed extract *in the remineralization of demineralized dentin: Micromorphological and physical analyses.* **Arch Oral Biol.** v. 58. p. 1769-1776. 2013.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica.** 2ª. Edição. Cap. 11 e 12. 1995.

VITORINO, R.; GUEDES, S.M.; FERREIRA, R.; LOBO, M.J.C.; DUARTE, J.; FERRER-CORREIA, A.J.; TOMER, K.B.; DOMINGUES, P.M.; AMADO, F.M.L.

Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. **Eur J Oral Sci.** v. 114. p. 147-153. 2006.

VITORINO, R.; LOBO, M.J.; DUARTE, J.; FERRER-CORREIA, A.J.; TOMER, K.B.; DUBIN, J.R.; DOMINGUES, P.M.; AMADO, F.M. In vitro hydroxiapatite adsorbed salivary proteins. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 320. p. 342-346. 2004.

WADE, W.G. New aspects and new concepts of “maintaining” microbiological health. **J Dent.** v.38 p. s21-s25. 2010.

WILLIAMSON, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. **Biochem J.** v. 297, p. 249-560, 1994.

WHITE A.J., GRACIA L.H., BARBOUR M.E. Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. **Caries Res.** v. 45, p. 13–20. 2010.

WU, C.D. Grape products and oral health. **J Nutr.** v. 139, p. 1818-1823. 2009.

YANG, F.; NING, K.; CHANG, X.; YUAN, X.; TU, Q.; YUAN, T.; DENG, Y.; HEMME, C.L.; NOSTRAND, J.V.; CUI, X.; HE, Z.; CHEN, Z.; GUO, D.; YU, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; XU, J. Saliva microbiota carry caries-specific functional gene signatures. **PLoS ONE.** v. 9, n.2, e. 76458. 2014.

YAO, Y.; BERG, E.A.; COSTELLO, C.E.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and human saliva using novel proteomic approaches. **J Biol Chem.** v. 278. p. 5300-5308. 2003.

YAO, J.W., XIAO, Y., LIN, F. Effect of various pH values, ionic strength and temperature on papain hydrolysis of salivary film. **Eur J Oral Sci.**

ZOLOTUKHIN, S. Metabolic hormones in saliva: origins and functions. **Oral Dis.** v.19, p.219-229. 2013.

ZAHRADNIK, R.T., MORENO E.C., BURKE E.J. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. **J Dent Res.** v. 55, p. 664–670. 1976.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Interferência da dieta na formação e função da película dental adquirida

**Pesquisador:** Elaine Machado Benelli

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 10858712.5.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 178.743

**Data da Relatoria:** 19/12/2012

**Apresentação do Projeto:**

O objetivo deste estudo é investigar como componentes líquidos da dieta podem alterar a composição e atividade da película dental adquirida. Para isso a película será formada in vitro, in situ ou in vivo em presença de diferentes líquidos. Após a exposição ao líquido as películas serão coletadas e a composição de proteína e suas atividades determinadas. Os resultados contribuirão para entender o potencial protetor ou prejudicial dos alimentos para erosão e cárie dental.

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigar como componentes líquidos da dieta podem alterar a composição e atividade da película dental adquirida;  
Caracterizar a composição proteica e atividade de amilase salivar, peroxidase, glicosiltransferase e lisozima na película dental adquirida formada in vivo, in situ ou in vitro após a exposição a bebidas à base de soja comercial e caseira, leite bovino e sucos naturais ou artificiais sobre as superfícies do esmalte para verificar como estas bebidas interferem na formação ou atividade da

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

película

dental adquirida;

- Estudar a interação de proteínas salivares e as proteínas presentes nas bebidas testadas por reações de cross-linking;
- Caracterizar a composição proteica da película dental adquirida formada in vitro e in situ sobre as superfícies do esmalte e dentina em um mesmo indivíduo, para verificar a existência de um padrão consenso de adesão de proteínas particular a cada superfície dental;

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos associados à metodologia são associados ao constrangimento dos indivíduos durante a coleta de saliva ou película dental adquirida. Assim, estas coletas serão realizadas de forma individualizada. Todo o material utilizado nestes procedimentos serão esterilizados em autoclave e o indivíduo que fará as coletas estará utilizando luvas, máscara, gorro e avental para evitar qualquer tipo de contaminação. Ainda, os pesquisadores apontam o risco de desconforto ao participante da pesquisa em permanecer o período de 4h sem poder ingerir alimentos e líquidos.

Em relação aos benefícios, os pesquisadores afirmam que a pesquisa contribuirá para entender o potencial protetor ou prejudicial de líquidos nos processos de cárie e erosão dental

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa em tela possui relevância científica, está bem estruturada e referenciada.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória foram apresentados de acordo com a recomendação deste CEP.

#### **Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências apontadas foram atendidas de acordo com o solicitado pelo relator.

- É obrigatório trazer ao CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para que seja carimbado com data de aprovação pelo CEP/Sd.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o sujeito como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondendo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 19 de Dezembro de 2012

---

Assinador por:  
Claudia Seely Rocco  
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br