

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAYNA SCHMITZ SILVA

INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENÓIS

CURITIBA

2016

JANAYNA SCHMITZ SILVA

INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES EPOLIFENÓIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências bioquímica, área de concentração setor de ciências biológicas Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

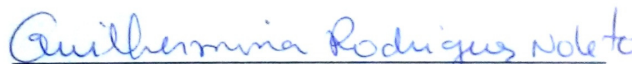
JANAYNA SCHMITZ SILVA

Interações de proteínas salivares e polifenóis

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Elaine Machado Benelli - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Profa. Dra. Guilhermina R. Noleto
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz
Departamento de Estomatologia, UFPR

Curitiba, 28 de março de 2016.

Aos pais Antônio Casturino Martins da Silva e Nilce Mara
Vaini Schmitz Silva.

À minha avó e também professora Eponina Martins da
Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, minha vida e todas as bênçãos.

A orientadora Professora Doutora Elaine Machado Benelli por sua companhia em todos os momentos e por sua orientação.

Ao meu estimado Adriano Mello Mattos Habib Gregori pela sua ajuda em todos os sentidos.

Aos voluntários por terem aceitado a participar da pesquisa, contribuindo desta forma no desenvolvimento da ciência.

Ao Professor Doutor José Miguel Amenabar pelo auxílio durante práticas no laboratório.

Ao técnico Valter por auxiliar na utilização dos aparelhos.

Aos colegas de laboratório que auxiliaram principalmente em novos experimentos Lara, Normanda, Tássia, Heloisa, Glaucia, Alexandre, Adrian Richard, Layane, Cristina, Estevan Tomassini,

Ao professor João Batista Novo professor no Departamento de Química na Universidade Federal do Paraná pelo auxílio em fluorescência.

Ao laboratório de Espectroscopia vibracional de Infravermelho.

Ao laboratório de Fixação de nitrogênio e biologia molecular pelos aparelhos usados para realização dos experimentos.

Ao departamento de bioquímica e biologia molecular e, ao setor de ciências biológicas

A Universidade Federal do Paraná pelo apoio a esta pesquisa bem como as agências financiadoras CAPES, CNPQ.

“Pois quando a sabedoria entrar no teu coração, e o conhecimento for agradável a tua alma, o bom siso te guardará e a inteligência te conservará” (Provérbios 2:10-11)

RESUMO

A saliva é um fluido produzido pelas glândulas salivares maiores, menores, fluídos gengivais e nasais, composta por proteínas e glicoproteínas. As proteínas salivares adsorvem-se a superfície da hidroxiapatita logo após a higiene bucal, formando a película dental adquirida do esmalte. A sua função é proteger o esmalte contra desmineralização e permitir a adsorção de bactérias originando o biofilme dental. Os microrganismos que compõe o biofilme dental permanecem em equilíbrio em condições compatível com a saúde. Entretanto, mudanças no comportamento do hospedeiro, alteram o equilíbrio do biofilme favorecendo o aparecimento da cárie e doença periodontal. Os polifenóis podem interagir com proteínas salivares e alterar sua conformação, modificando estrutura e função da película dental adquirida do esmalte. O objetivo deste trabalho foi verificar as interações dos polifenóis resveratrol, epigallocatequina-galato, epigallocatequina e ácido gálico com saliva total. O *pool* de saliva estimulada coletado foi diluído e concentrações crescentes de cada um dos polifenóis foram adicionados. Em seguida, o espectro emissão de fluorescência de 300 a 500 nm das amostras com excitação em 282 nm foram obtidos. Os resultados mostraram que com o aumento da concentração dos polifenóis ocorreu diminuição da emissão de fluorescência do triptofano em 350 nm. Esta redução foi maior para epigallocatequina-galato, seguido do resveratrol e epigallocatequina. Ácido gálico não interagiu com as proteínas salivares nas condições testadas. A epigallocatequina-galato interage com as proteínas salivares por mecanismos dinâmicos e estáticos, enquanto que os demais polifenóis interagem por mecanismo dinâmico ou colisional. Além disso, todos os polifenóis foram capazes de reduzir a atividade da α -amilase salivar. Entretanto, as interações dos polifenóis e as proteínas da saliva total só foi observada em concentrações superiores as obtidas através da dieta. Assim, este estudo sugere que provavelmente *in vivo* estes polifenóis não seriam capazes de afetar a estrutura e atividade dos complexos de proteínas salivares e manteriam a homeostase do organismo.

Palavras chaves: Polifenóis, Saliva, Proteínas e Peptídios salivares

ABSTRACT

Saliva is a fluid produced by the salivary major and minor glands, gingival and nasal fluids, composed of proteins and glycoproteins. The salivary proteins adsorb to the hydroxyapatite surface after oral hygiene, forming a dental film called the enamel acquired pellicle. Its function is to protect against the enamel demineralization and allow adsorption of bacteria forming the dental biofilm. Microorganisms in the biofilm remain in equilibrium under conditions compatible with health, however, changes in host behavior, alter the balance of the biofilm leading to caries and periodontal disease. The polyphenols can interact with salivary proteins and change their conformation by modifying the structure and function of dental enamel film acquired accordingly. The aim of this study was to study the interactions of polyphenol resveratrol, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and gallic acid with total saliva. The stimulated saliva was collected and the pool was diluted and increasing concentrations of each polyphenol were added. Following, emission spectrums of the fluorescence of the total saliva (300 to 500 nm) with excitation at 282 nm were obtained. The results showed that with the increase of the polyphenols occurred a decreased tryptophan fluorescence emission at 350nm. This reduction was major for epigallocatechin-gallate, followed by resveratrol and epigallocatechin. Gallic acid did not interacted to total saliva protein at this experimental condition. The epigallocatechin-gallate interacts with salivary proteins by dynamic and static mechanisms, while other polyphenols interact by dynamic mechanism or collisional. Moreover, all polyphenols were able to reduce the activity of salivary α -amilase. However, the polyphenols interactions with the total of salivary protein were observed at concentration higher than those obtained by the diet. Thus, this study suggests that probably *in vivo* these polyphenols are not able to alter the structure and activity of the salivary protein complex and it would keep the organism homeostasis.

Key words: Polyphenols, Saliva, Proteins and Peptides salivary

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENOIS.....	26
FIGURA 2 – CINÉTICAS ENCONTRADAS NO PLOT DE STERN-VOLMER	34
FIGURA 3 – PERFIL ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENOIS	35
FIGURA 4 – PERFIL ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENOIS	36
FIGURA 5 – ESPECTROS DE EMISSÃO DO TRIPTOFANO COM EXCITAÇÃO DE 282 nm NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIFENOIS.....	37
FIGURA 6 – ESPECTRO DA SUBTRAÇÃO DE EMISSÃO DO TRIPTOFANO DAS PROTEÍNAS SALIVARES EM PRESENÇA DE RESVERATROL	38
FIGURA 7 – INTENSIDADE RELATIVA DA FLUORESCÊNCIA (RFI) EMITIDA PELO TRIPTOFANO PARA O POOL DE SALIVA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE POLIFENÓIS.....	39
FIGURA 8 – GRÁFICOS DE STERN-VOLMER DO POOL SALIVAR EM PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE POLIFENOIS.....	41
FIGURA 9 – ATIVIDADE DA α -AMILASE SALIVAR NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DOS POLIFENOIS.....	42

LISTAS DE QUADROS

QUADRO 1 – COMPONENTES DA SALIVA E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES..	17
QUADRO 2 – PRINCIPAIS PROTEÍNAS DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA DO ESMALTE E SUAS FUNÇÕES.....	20
QUADRO 3 – REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS POLIFENÓIS.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	15
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 COMPOSIÇÕES DA SALIVA.....	16
3.2. FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE PROTEÍNAS SALIVARES E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	18
3.3. PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA.....	19
3.4. BIOFILME.....	21
3.5. DIETA E PELÍCULA DENTÁRIA.....	23
3.6. INTERAÇÃO PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENÓIS.....	24
3.7. POLIFENÓIS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO.....	30
4.2. ASPÉCTOS ÉTICOS.....	30
4.3. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	30
4.4. COLETA SALIVA TOTAL.....	30
4.5. POLIFENÓIS SELECIONADOS.....	30
4.6. INTERAÇÃO DOS POLIFENÓIS COM PROTEÍNAS SALIVARES EM SOLUÇÃO. 31	
4.6.1. Determinação de alterações dos perfis proteicos do <i>pool</i> salivar em presença dos polifenóis.....	31
4.6.2. Efeito dos polifenóis na estrutura das proteínas salivares.....	31
4.6.3. Efeito dos polifenóis na atividade α -amilase salivar.....	31
4.7. MÉTODOS GERAIS.....	32
4.7.1. Dosagem de Proteínas.....	32
4.7.2. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes.....	32
5. RESULTADOS	35
5.1. EFEITO DOS POLIFENÓIS SOBRE PROTEÍNAS SALIVARES.....	35
5.2. SUPRESSÃO FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO PROTEÍNAS SALIVARES.....	38
5.3. INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENÓIS.....	40
5.4. EFEITO DOS POLIFENÓIS NA ATIVIDADE DA α -AMILASE SALIVAR.....	41

6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	67

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é banhada pela saliva que é formada pelas secreções das glândulas salivar maiores, menores, fluidos gengivais e nasais. Logo após a higiene bucal, as superfícies dentais são recobertas por macromoléculas, principalmente proteínas salivares que adsorvem a superfície da hidroxiapatita (HA) especificamente, formando a película dental adquirida do esmalte. Esta película tem função protetora contra erosão e desmineralização, além de servir como ancora para a adesão bacteriana e formação do biofilme dental (NYVAD e KIIAN, 1987; OPHIR e GUTNICK, 1985).

O biofilme é um denso agregado de diversos microrganismos, embebido numa matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) de origem bacteriana (CVITKOVITCH *et al.*, 2003, MARSH, 2004). O padrão geral de formação do biofilme inclui a adesão inicial de microrganismos a uma superfície, a multiplicação dos microrganismos, formação de microcolônias, produção de uma matriz de PEC e finalmente, a diferenciação em um biofilme tridimensional (LI & BOWDEN, 1985; O'TOOLE *et al.*, 2000).

Os nutrientes são dissolvidos na saliva total e podem adsorver a superfície dental e ao biofilme. Assim, parece possível que constituintes da dieta possam interagir com proteínas salivares, interferir na formação da película dental adquirida e na formação do biofilme. Como a cárie e periodontite são doenças associadas ao acúmulo de biofilme na superfície dental, constituintes da dieta poderiam alterar a suscetibilidade a estas doenças.

Algumas substâncias como os polifenóis que são encontrados no cacau, café, chás, cervejas, linhaça, aveia, trigo, leguminosas, canola, centeio e uvas podem auxiliar no controle de doenças como o câncer e doenças cardiovasculares como é o caso do chá verde que apresenta além desses benefícios, exercem efeitos na redução da atividade microbiana, na produção de biofilmes e na produção de ácidos produzidos por *S. mutans* (AMORIM, FERREIRA e NAVARRO, 2007; KHAN e MUKHTAR, 2007; SHI *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2010; GIACAMAN, CONTZEN, SANDOVAL-MUÑOZ, 2014; MUHAMMAD *et al.*, 2014; RIIHINEN *et al.*, 2014). Os polifenóis interferem na adsorção do *S. mutans* a superfície dental e possuem ação antimicrobiana (FERRAZZANO *et al.*, 2009). Além disso, os polifenóis interferem na

formação na formação do biofilme dental (XU, ZHOU e WU, 2012; STAUDER *et al.*, 2010; KHAN e MUKHTAR, 2007; SHI *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2010; GIACAMAN, CONTZEN, SANDOVAL-MUÑOZ, 2014; MUHAMMAD *et al.*, 2014; RIIHINEN *et al.*, 2014; XU, ZHOU e WU, 2012).

Assim, este trabalho investiga se os polifenóis interagem com proteínas da saliva total o que poderia sugerir uma interferência na formação da película dental adquirida e conseqüentemente na formação do biofilme dental.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi verificar as interações de diferentes polifenóis com o *pool* de proteínas salivares.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as interações do resveratrol, epigallocatequina-galato, epigallocatequina e ácido gálico com as proteínas da saliva total através dos espectros de supressão de fluorescência do triptofano e eletroforese desnaturante;
- Avaliar a atividade da α -amilase salivar na presença destes polifenóis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÕES DA SALIVA

A saliva é formada por secreções das glândulas parótidas, submandibular, sublingual e glândulas salivares menores, além de componentes como alimentos, microrganismo e secreções nasais. A saliva contém hormônios, água, eletrólitos, proteína, açúcares e lipídios. As funções específicas dos componentes salivares relacionadas com a saúde bucal estão listadas no quadro 1. Além destas características funcionais, têm-se como outras atribuições biológicas da saliva, a lubrificação, proteção contra microrganismos, manutenção da integridade e hidratação da mucosa, auxilia na fala e na mastigação, protege os dentes contra desmineralização e favorece a sua remineralização. Apresenta enzimas capazes de auxiliar no processo digestivo e proteção contra microrganismos (LOO *et al.*, 2010, KAUFMAN& LAMSTER, 2002).

As proteínas salivares, hormônios, imunoglobulinas e proteínas antimicrobianas são marcadores biológicos. A saliva apresenta quantidades significativas de proteínas e ácidos nucleicos, que refletem o estado fisiológico do indivíduo e, por ser de fácil acesso para coleta e análises, auxiliam no diagnóstico de doenças (VUKOSAVLJEVIC, CUSTODIO, SIQUEIRA, 2011; LEE, H.Y.; WONG, T.D, 2009).

Dentre as proteínas encontrada na saliva estão a α -amilase, a lactoferrina, imunoglobulina, anidrase carbônica, albumina, peptídeos como a cistatinas, estaterina, lisozimas e as proteínas ricas em prolina (PRPs) (PERINPANAYAGAN *et al.*, 1995; VITORINO *et al.*, 2004). As proteínas salivares apresentam uma função importante como um fator de proteção para a superfície dental evitando a erosão e a desmineralização do esmalte, as proteínas como a citoquinina, fatores de crescimento de fibroblastos, auxiliam na proliferação das células da mucosa e na sua diferenciação, as interleucinas e endotelial vascular e fator de crescimento, ajudam na cicatrização de feridas e no controle de inflamações (LOO *et al.*, 2010).

Algumas destas proteínas apresentam 35 a 40% de prolina, na sua composição e são designadas como proteínas ricas em prolina (PPR) e constituem 70% do conteúdo total de proteínas salivares originadas da parótida humana, enquanto a α -amilase corresponde 30% das proteínas totais da saliva. Outras

proteínas como lisozima, estaterina, lactoferrina, peroxidase e IgA secretora tem recebido mais atenção, embora sejam relativamente menor na composição em relação as demais proteínas (DODDS e YEH, 2005). A estaterina é uma proteína que auxilia na manutenção da saturação dos sais de cálcio e de fosfato (GIBBONS *et al.*,1998),

A mucina é uma proteína produzida nas glândulas submandibular e sublingual e, é, responsável por manter a hidratação bucal e liga-se a toxinas, bactérias, e células hospedeiras além de fazer parte da película adquirida protegendo o esmalte contra a erosão (AMERONGEN, ODERKERK e DRIESSEN,1987).

A concentração de componentes como sódio, bicarbonato, fosfato, uréia e proteínas, bem como o pH salivar podem variar de acordo com diversas situações (DAWES e KUBIENIEC, 2004). Foi observado que exercícios físicos levam ao aumento da secreção da saliva e proteínas como amilase, lisozima, MUC5B (LIGTENBERG *et al.*, 2015). O contrário é visto em exercícios acima de 2 horas devido à desidratação, no qual se observa diminuição da secreção de saliva (Ljungberg *et al.*, 1997). Além dos exercícios físicos, foi visto que a desnutrição pode levar também a diminuição da fluído na cavidade bucal (BATISTA E MOREIRA 2007).

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

QUADRO1–COMPONENTES DA SALIVA E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES

FONTE: ARCHETTI(2014)

3.2. FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE PROTEÍNAS SALIVARES E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Na saliva as proteínas formam complexos (SOARES *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2012), cuja função biológica é proteger as proteínas da proteólise e/ou encaminhar as proteínas salivares a diferentes locais da cavidade bucal (MOFFA *et al.*, 2015). A histatina 1 proteína relacionada a inibição da desmineralização do esmalte é capaz de complexar a 43 proteínas salivares e além das funções já mencionadas acima, o complexo modula a atividade biológica das proteínas que o formam (SIQUEIRA *et al.*, 2012). Já histatina 5, apresenta atividade anti-fúngica contra *Candida albicans* (POLLOCK *et al.*, 1984) um fungo oportunista é capaz de complexar a 52 proteínas salivares diferentes (MOFFA *et al.*, 2015). As mucinas salivares de alto e baixo peso molecular, mucina 5B (MG1) e mucina 7, respectivamente, complexam com α -amilase, PRP 2 ácidas, PRP 3 básicas, estaterina, SIgA, lactoferrina e histatina 1 (SOARES *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005).

Apesar do estudo de Moffa *et al.* (2015) não ter identificado os locais de formação dos complexos de histatina 5 e outras proteínas salivares, estes autores sugerem que estes complexos podem ser formados no interior das glândulas salivares ou na cavidade bucal.

Nas glândulas salivares observa-se uma maior quantidade de proteína salivares integras em relação à saliva coletada. A histatina, por exemplo, encontra-se integra na glândula salivar, no entanto ao ser misturada a saliva total esta proteína desaparece, isso se deve possivelmente a proteólises (Sun *et al.*, 2009). No entanto, quando histatina 1 presente na saliva total combinada a outras proteínas salivares, esta não sofre degradação (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Da mesma forma quando a histatina 1 liga-se a hidroxiapatita do esmalte há resistência a proteólise (MCDONALD *et al.*, 2011). Assim, a formação de complexos proteicos e a adsorção das proteínas aos seus tecidos alvos aumenta o tempo de vida das proteínas salivares na cavidade bucal. Os complexos também modulam a atividade das proteínas salivares. Histatina 5 quando complexada α -amilase apresenta uma redução significativa da atividade antifúngica.

3.3. PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

A película dental adquirida é um filme que se forma sobre os dentes, isenta de bactérias e composta por mucinas, glicoproteínas, proteínas e diversas enzimas (HANNING & HANNING, 2005). Aproximadamente 130 proteínas diferentes foram identificadas da película dental adquirida humana formada *in vivo*, sendo 14.4% derivadas de glândulas salivar, 67.8% de células e 17.8% originada de soro vindo através de fluido crevicular (SIQUEIRA, ZHANG, HELMERHORST, 2007). O esmalte dental tem uma composição distinta por ser uma superfície mineral. A predominância maior de proteínas na película é de estaterina, proteínas ricas em prolina, essenciais para remineralização e desmineralização do esmalte (LENDEMANN, GROGAN e OPPENHEIM, 2000; HANNIG & HANNIG, 2005).

A estaterina é considerada uma proteína específica da película do esmalte, por ligar-se facilmente ao Ca^{+2} da hidroxiapatita e liga-se com menor afinidade as células da cavidade bucal (GIBBINS *et al.*, 2014).

O processo de adsorção de proteínas na superfície de ligação é em geral complexo devido à quantidade, tamanho e concentração das proteínas individuais. Este processo ocorre devido as forças eletrostática, pontes de hidrogênio, ligações específicas e *cross-linking*. Outros fatores como composição iônica pode influenciar na formação da película salivar, com o aumento ou diminuição do nível de interação eletrostática (RAYNAL e HARDINGHAM, 2003).

O quadro 2 mostra algumas das proteínas da película dentária adquirida e suas respectivas funções. A formação da película dental adquirida inicia pela adsorção de proteínas salivares intactas e fragmentadas de diferentes fontes e sofre influencia das modificações ambientais da cavidade bucal, como por exemplo ciclo circadiano, composição da flora microbiana bem como propriedades físico-química das superfícies dos dentes. A fase inicial da formação da película dental adquirida ocorre dentro de segundos de exposição à saliva e levando a um aumento na espessura da película para 10 a 20 nm em alguns minutos, e permanece assim em estabilidade cerca de 30 minutos (LENDEMANN *et al.*, 2000).

As proteínas que apresentam maior afinidade com a hidroxiapatita são conhecidas como “precursores de película” iniciam este processo através de interações eletrostáticas com a superfície do esmalte (HAY, 1973). As estaterina e

histatinas são consideradas precursoras, pelo fato de ser uma das primeiras a absorver a hidroxiapatita (JENSEN *et al.*, 1992 e LAMKIN *et al.*, 1996).

Em relação à abundância de proteínas na película dental adquirida, estudos *in situ* mostram que as MUC5B, MUC7, α -amilase, cistatinas, lisozima, lactoferrina estão presentes em maiores quantidades na película dental adquirida segundo Vacca, Smithe Bowen, 2000; Hanninge e Jonier, 2006 (apud SIQUEIRA, CUSTÓDIOe MCDONALD 2012).

Estudos mostram que a película dental adquirida formada *insitu* 3 minutos após a exposição à saliva protege os dentes contra erosão provocada por ácidos. Assim, a película age como uma barreira evitando contato direto entre ácidos e os dentes (HANNING *etal.*, 2004).

PROTEÍNAS DA PELÍCULA	FUNÇÕES
Aglutinina	Agregação de bactérias
Catelicidina (LL37)	Propriedadesantibacterianas de amploespectro
Cistatinas (VEGh)	Inibidor de protease
Defensinas	Propriedadesantibacterianas de amploespectro
EP-GP	Desconhecidas
Histatinas	Propriedadesantibacterianas de amploespectro
Imunoglobulinas	Inativação e agregação de bactérias
Lactoferrina	Propriedades antibacterianas
Lactoperoxidase	Inibição de crescimento
Lisozima	Propriedades antimicrobianas
MUC5B (Mucina MG1)	Barreira de difusão de protons
MUC7 (Mucina MG2)	Agregação
Glicoproteína ricaS em prolina	Desconhecida (Agregação?)
Proteínas ricas em prolina (aPRP)	Aderência
Proteínas ricas em prolina (bPRP)	Desconhecida (Interfere na membrana?)
Estaterina	Inibe a precipitação de calico

QUADRO 2–PRINCIPAIS PROTEÍNAS DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA DO ESMALTE E SUAS FUNÇÕES.

FONTE: VACCA, SMITH E BOWEN(2000)

3.4. BIOFILME

As proteínas que compõe a película dental adquirida adsorvida a HA, sofrem alterações conformacionais expondo sítios adequados para a ligação dos colonizadores primários: *Streptococcusgordonni*, *Streptococcussanguis* e *Streptococcusparasanguis*, os quais constituem de 60 a 80% da população bacteriana inicial (NYVAD & KIIAN, 1987; OPHIR & GUTNICK, 1985). Os colonizadores primários possuem receptores superficiais que são reconhecidos pelas adesinas dos colonizadores secundários iniciando o processo de sucessão bacteriana. Posteriormente, as adesinas dos colonizadores tardios ligam-se aos receptores dos colonizadores secundários formando a comunidade clímax do biofilme(KOLENBRANDER & LONDON, 1993; BOS *et al.*, 1985; KOLENBRANDER, 1998; KOLENBRANDER *et al.*, 2000).

Neste caso, o biofilme é considerado um denso agregado de diversos microrganismos, embebido numa matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) de origem bacteriana e polímeros provenientes do hospedeiro (CVITKOVITCH *et al.*, 2003; MARSH, 2004). O padrão geral de formação do biofilme inclui a adesão inicial de microrganismos a uma superfície, a multiplicação, formação de microcolônias, produção de uma matriz de PEC e finalmente, a diferenciação em um biofilme tridimensional (LI & BOWDEN, 1985; O'TOOLE *et al.*, 2000). Uma vez estabelecido na superfície dentária, o biofilme mantém sua composição microbiana relativamente constante, apesar da exposição dos microrganismos a uma variedade de perturbações ambientais, tais como: ingestão de alimentos e bebidas, mudanças hormonais, higiene bucal entre outras. A adaptação microbiana ao ambiente bucal resulta de um balanço nas tensões dinâmicas que surgem das interações sinérgicas e antagônicas entre diferentes organismos (MARSH, 1985; MARSH, 1995).

Estas bactérias presentes na cavidade bucal permanecem em homeostase no biofilme. A composição microbiana do biofilme, apresenta certa estabilidade principalmente em condições no qual o pH bucal é neutro. Além disto, sobre condições de saúde, o biofilme dental desempenha um papel importante no que se refere aos mecanismos de defesa natural do hospedeiro. No entanto, o desequilíbrio do biofilme devido a mudança do estilo de vida do indivíduo causa cárie e doença periodontal. As bactérias presentes no biofilme, quando expostas a situações que conflitam com um estado de saúde compatível, como tabagismo, práticas

inadequadas de higiene, processo de envelhecimento, consumo frequente de açúcar estimulam a microbiota associada a um estado de doença (JENKINSON e LAMONT, 2005; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; MARSH, 2006).

Com o aumento da ingestão de carboidratos fermentáveis pelo hospedeiro, aumenta a produção de ácidos que reduzem o pH no biofilme favorecendo o crescimento de microrganismos acidogênicos e acidúricos que produzem mais ácidos que provocam a desmineralização da hidroxiapatita originando a cárie dental (MARSH, 2003)

Na presença de sacarose, alguns microrganismos como *S. mutans*, produzem glicoltransferase (GtfB, GtfC e GtfD) são adsorvidas as superfícies dentais e/ou bacterianas podendo produzir glucanos insolúveis em água (VENKITARAMAN *et al.*, 1995; VACCA E SMITH-BOWEN, 1998; BOWEN E KOO, 2011). Além disso, na presença deste dissacarídeo *S. mutans* também secreta frutossiltransferase (Ftf) que produz frutanos que participam da formação do biofilme e ligação de bactérias cariogênicas favorecendo seu acúmulo (ROZEN *et al.*, 2001, 2004).

Portanto, a ingestão de alimentos ricos em carboidratos fermentáveis auxiliam na redução do pH bucal favorecendo a predominância de bactérias acidogênicas e sua aderência na superfície do dente contribuindo com a formação do biofilme, que nesta condições aumentam a suscetibilidade a cárie e doença periodontal.

O desequilíbrio do biofilme dental também pode causar doença periodontal. A periodontite é uma doença crônica causada pela inflamação do tecido periodontal, que leva a destruição dos ligamentos e reabsorção óssea devido ao aumento do biofilme dental (KODOVAZENITIS *et al.*, 2011). A periodontite pode afetar outras partes do corpo, especialmente o coração (MARUYAMA E SATO, 2016; SHIHEIDO *et al.*, 2016). O estilo de vida e hábitos do indivíduo podem agravar o estado da doença (JANG *et al.*, 2016; MARUYAMA E SATO, 2016). O aumento do biofilme dental provocado principalmente pelo estilo de vida do indivíduo inicia o processo inflamatório que modifica as condições do meio favorecendo a predominância de bactérias Gram-negativas agravando a doença (MARCH, 2003).

O desequilíbrio do biofilme dental é causado pelo estilo de vida do indivíduo que conduz a condições favoráveis para desenvolvimento da cárie e da doença periodontal. O biofilme sacarose independente em equilíbrio protege ao hospedeiro. SOCRANSKY e HAFFAJEE (2000 citado por Nunes *et al.*, 2007, p 55-61).

A alimentação depende do estilo de vida do indivíduo e pode interferir na formação da película dental como descrito a seguir.

3.5. DIETA E PELÍCULA DENTÁRIA

A alimentação pode influenciar sobre a formação da película dental adquirida, alterando sua composição. O efeito da dieta sobre a composição da película dental adquirida foi primeiramente observado por Rykke e Sonju (1991). Neste estudo, a composição química das películas formadas *in vivo*, após 24h de jejum e 2h sem consumo de alimentos e bebidas foram semelhantes. Entretanto, a composição da película formada 24h após uma dieta normal foi diferente, indicando que a dieta contribuía para formação da película. Mudanças no peso molecular e no número de proteínas que se depositam na película dentária foram observadas após enxague bucal com o leite ou com a kappa-caseína (VACCA SMITH e BOWEN, 2000). Neste sentido, o potencial da erosão dentária pode diminuir com a adição de caseína a soluções ácidas e refrigerantes (HEMINGWAY e PARKER, 2010).

As proteínas do iogurte não foram capazes de adsorver ao esmalte (DEVOLD *et al.*, 2006). Já as bactérias probióticas podem afetar a ecologia por prevenir aderência de bactérias e modificando a composição da película dentária (HAUKIOJA *et al.*, 2008). Algumas proteínas do leite humano como: IgA secretora, BSSL-lipase estimulada por sais biliares, lactoferrina, albumina, β -caseína e lisozima aderem a HA (WERNERSSON *et al.*, 2006). TEIXEIRA *et al.* (2006, 2007) mostram que as lectinas de algas adsorvem junto a película e são capazes de inibir a adsorção de *Streptococcus* no biofilme. Finke *et al.* (2002) mostraram em estudo *in situ* que o consumo de certas bebidas gaseificadas aumentou a espessura da película. Hemingway *et al.* (2010) com objetivo de investigar os efeitos da caseína e ovoalbumina na erosão do esmalte *in vitro*, observou que esses componentes apresentam efeitos anti-erosivos, Van der Mei, (2010) verificou em experimentos *in vitro e in vivo* que leite e óleo de salada aumentaram a hidrofobicidade da película e soluções com açúcar, aumentaram a hidrofilicidade. Hanning *et al.* (2009) em uma investigação de alterações e propriedades da película durante o consumo de bebidas ácidas, verificou que sucos são menos danosos que refrigerantes de baixo pH. Duarte *et al.* (2006) constatou que antocianinas, flavonóis e proantocianidinas

presentes no *cranberry* conseguiam inibir a glicosiltransferase, reduziam a produção de ácido por *S. mutans* e influenciaram o desenvolvimento do biofilme, Koo *et al.* (2010) mostraram que sementes de uva são capazes de reduzir a formação do biofilme por *S. mutans*. Os óleos comestíveis reduzem o efeito protetor da película contra a erosão dental e não afetam o perfil de colonização do biofilme (HANNIG *et al.*, 2012; 2013).

Em presença de *Caricapapaya* a película é desestruturada e/ou é completamente removida (YAO *et al.*, 2012). Componentes dos chás e do vinho ligam-se fortemente a proteínas da película, aumentando sua espessura (JOINER *et al.*, 2003; JOINER *et al.*, 2004; JOINER *et al.*, 2006). Os polifenóis do chá preto interagem com a película mudando sua estrutura e função (PROCTOR *et al.*, 2005). Bochecho com os chás diminuiu a atividade de peroxidase na película (HANNIG *et al.*, 2008). Uma revisão de literatura mostrou que os polifenóis de chás apresentam um efeito cariostático (KHAN e MUKHTAR, 2007). Recentemente, Archetti (2014) mostrou que sucos de uva integral e reconstituído são capazes de interagir com as proteínas salivares e, que, alguns componentes dentre eles polifenóis podem ligar-se a película dental adquirida.

3.6. INTERAÇÃO PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENÓIS

A adstringência sentida após o consumo de alimentos ricos em polifenóis é atribuído principalmente devido à interação entre taninos e proteínas salivares. Proteínas ricas em prolina (PRP), histatinas e estaterinas as proteínas mais reativas nesta interação (GREGORIO, MATHEUS e FREITAS, 2014). Após as observações de Hagerman e Butler (1981) em que proteínas salivares de ratos mostraram afinidades para taninos, outros estudos foram desenvolvidos com intuito de investigar a natureza destas interações (BENNICK, 2002). Mehansho *et al.*, (1985) avaliaram a afinidade de PRP básico e PPRs de saliva de ratos. Lu e Bennick (1998) avaliaram a capacidade das PRP humana purificada em formar complexos insolúveis com taninos. Yan e Bennick (1995) mostraram que moléculas com alto peso molecular e maior concentração de prolina não necessariamente favorecem a interação entre proteínas salivares e taninos, uma vez que estes mesmo autores constataram que a histatina, um peptídeo desprovido de prolina foi capaz de

precipitar na presença de taninos. Naurato *et al.* (1999) demonstraram que histatinas 3 e 5 compartilham a mesma região de ligação ao tanino. Soares, Mateus e Freitas (2007) observaram a interação entre polifenóis como catequina, epicatequina, epigallocatequina-galato, malvidina-3-glucosídeo, taninos ácidos, procianidina B2 galato e procianidina com α -amilase salivar em relação a adstringência. Estes autores concluíram que as estruturas dos polifenóis tem interferência na capacidade de supressão da fluorescência e, que, proteínas diferentes interagem de forma diferente com os mesmos polifenóis devido a diferentes estruturas tridimensionais das proteínas salivares. Wroblewski *et al.* (2001) identificaram que o epigallocatequina-galato (EGCG), interage com resíduos básicos e aromáticos em proteínas com a histatina 5.

Esta capacidade de proteínas salivares interagirem com taninos se deve principalmente pela necessidade em neutralizar os taninos contidos na dieta. Andrews e Martin (1991) relatam que ancestrais dos humanos atuais apresentavam mais tolerância e adaptação a dietas à base de frutas, e com isso pareciam ter maior capacidade em neutralizar os taninos contidos na dieta e, primatas como os macacos a presença de histatinas está relacionada com a dieta.

A histatina também está presente na saliva do mico e esquilo que além de ingerirem insetos possuem também uma dieta a base de frutas e plantas (AZEN *et al.*, 1978). A presença elevada de histatinas e proteínas ricas em prolina em homínídeos são consideradas um ponto chave no processo evolutivo da alimentação, que permitiu o homem em especial, ingerir vários alimentos que em outras situações, não seriam permitidos devido ao elevado teor de taninos. A dieta de homínídeos era constituída principalmente de legumes, nozes e frutas aproximadamente a 4,5 quilogramas, para atender suas necessidades energéticas diárias. Assim, a ingestão de quantidades elevadas de plantas criou-se a necessidade dos nossos ancestrais em neutralizar esses taninos presentes na dieta. Isso pode explicar a elevada concentração de proteínas que ligam a taninos na saliva humana (JENKINS *et al.*, 2001).

3.7. POLIFENÓIS

Compostos fenólicos são estruturas que quimicamente apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, podendo estar dispostos na forma simples ou de polímero que possuem efeito antioxidante. Podem ser encontrados em forma natural em vegetais ou sintéticos, podendo estar também livres ou complexados a açúcares e proteínas. Exemplos de grupos fenólicos são os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (ANGELO e JORGE, 2007). Os polifenóis estão presentes em diversos alimentos, como, legumes, cereais, frutas, chás vinho tinto e café também são fontes de polifenóis (Figura 1).

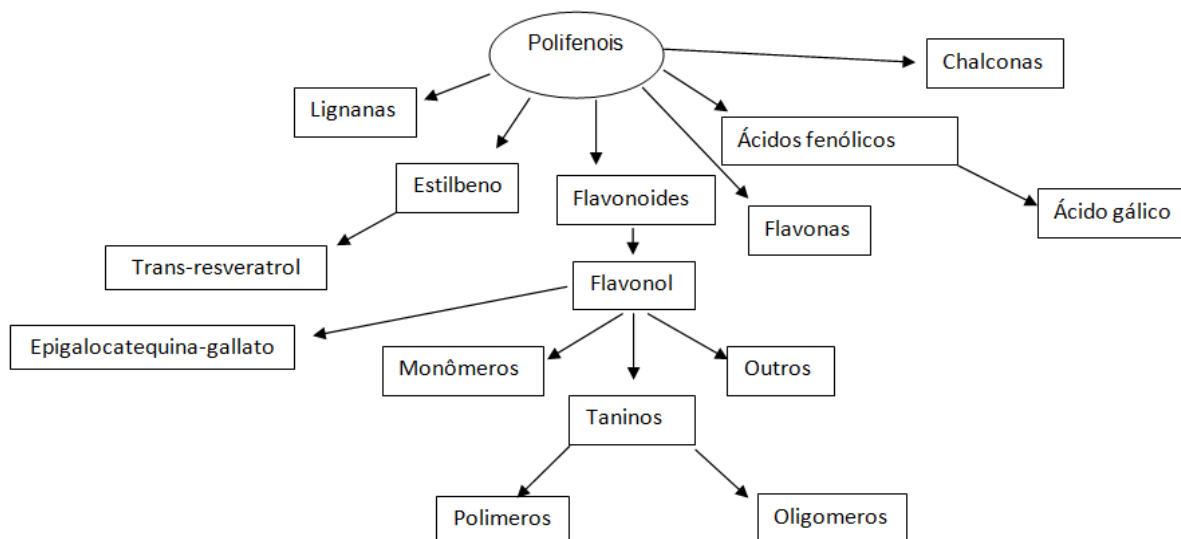


FIGURA 1—CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS
 FONTE: Adaptado de FERRAZZANO *et al.*,(2011)

A concentração de polifenóis nos alimentos pode variar com fatores ambientais, fatores genéticos e outras tecnologias que podem melhorar a concentração deste componente fenólico. Os polifenóis são componentes importantes para a saúde humana e seu benefício depende da quantidade ingerida e do tipo de polifenol. A proantocianidinas, por exemplo, possui baixa absorção e sua ação no organismo ocorre no intestino. As antocianinas parecem ter as mesmas características quanto à absorção (MANACH *et al.*,2004).

O efeito antioxidante dos polifenóis, na prevenção do envelhecimento e doenças crônicas e degenerativas como as cardiovasculares e da diabetes tem sido estudados. Pesquisas mostram reduções no risco de doenças cardiovasculares e câncer e em culturas de células em animais mostrando benefícios do consumo do chá em fases específicas com I e II nas enzimas hepáticas, gene de transcrição, proliferação das células e outras funções em níveis moleculares (KHAN e MUKHATAR, 2007).

A epigalocatequina-galato, um polifenol presente no chá verde, apresenta capacidade de diminuir atividade bacteriana, desenvolvimento de cânceres e doenças cardiovascular. Estes benefícios são devido a presença de flavonóides, catequinas e outros grupos fenólicos que possuem capacidade de inibir a ação dos radicais livres existentes no organismo. Aproximadamente três bilhões de quilogramas deste chá são produzidos por ano, através de folhas não fermentadas e não oxidadas de *Camelliasinensis*, da família *Theaceae*, que possui diversos grupos fenólicos, que representam aproximadamente 30% do peso seco, das folhas frescas. Os flavonóides em maior quantidade nestas folhas são epicatequina, galocatequina, epicatequina-galato (EGCG). Este último é considerada a catequina mais ativa (AMORIM, FERREIRA e NAVARRO, 2007).

Com o aumento do interesse desta substância na promoção de saúde, os chás em especial o chá verde, tem sido incluído na alimentação e considerado alimento funcional (ROCCARO *et al.*, 2004, HIGDON & FREI, 2003; MORAIS *et al.*, 2009). Em relação à saúde bucal, foi visto que epigalocatequina-galato (EGCG) é capaz de diminuir a produção de ácido pelo biofilme dental e também por *S mutans*, além de reduzir o biofilme dental (HIRASAWAM.; TAKADAK e OTAKES, 2006; DU *et al.*, 2012; XU, ZHOU e WU, 2011; 2012)

Este polifenol também interage com as proteínas salivares. Após o EGCG entrar em contato com a saliva, proteínas salivares como α -amilase, S100 e cistatinas foram precipitadas. As mucinas MUC5B e MUC7 sofreram alterações de suas propriedades e sedimentaram rapidamente com o aumento da concentração de MUC5B (DAVIES *et al.*, 2014). Além deste resultado, foi observado que o EGCG também inibe a função da α -amilase por inibição não competitiva. Essa inibição é importante na prevenção da formação de carboidratos fermentáveis que quando

metabolizados pelo micro-organismo do biofilme produzem ácidos que contribuem para o desenvolvimento da cárie dental (HARA *et al.*,2012).

O EGCG, também pode influenciar na inibição na formação de biofilmes maduros por *S. mutans*, através da supressão do gene *gtfa* nível da transcrição, sendo considerado um polifenol que interfere na virulência das bactérias responsáveis pela cárie, entretanto, esses mecanismos não estão completamente esclarecidos (XU, ZHOU e WU, 2012). Comparando EGCG com clorexidinedigluconato comumente utilizados como um agente desinfetantes bucais, EGCG não teve o mesmo efeito na eliminação do *S. mutans* relacionada a lesões de cáries de dentinas nas concentrações citadas no estudo (ASSIS *et al.*, 2015).

Em uvas bordo o ácido gálico esta presentes nas cascas em maior quantidade de Miriquetina 3-glucosideo esta presente tanto em cascas com em polpas da uva. Ácido hidroxicinâmico e os seus derivados provenientes do ácido cafeico estão presentes em quantidades nas cascas de uvas. O resveratrol está presente em uvas bordô em maior proporção nas cascas desta fruta. Nas sementes de uva encontramos a proantocianidina (PA), este é um polifenol que garante fortalecimento de tecidos colagenosos. Em cranberry, pode inibir a atividade das glucosiltransferase adsorvidas, e a produção de ácidos por *S. mutans* (KOO *et al.*,2010).

Em sementes de uvas, morangos, mirtilos, hamamélis, chás e vinho tinto, encontramos outro fotoquímico, o ácido gálico (LÓPEZ *et al.*, 2011). É um composto fenólico com efeitos antioxidantes, antiviral, oferece proteção cardiovasculares, anticâncer, anti-inflamatório. E tem apresentado bons resultados nos tratamentos com efeito antioxidantes nos tratamentos de hepatite C, com diminuição de espécies reativas de oxigênio (SALAS *et al.*, 2016). Alguns estudos usando ácido gálico foram usados para promoção de saúde bucal, foi verificado que ácido gálico tem papel importante no fortalecimento de células acinares da saliva humana, após exposição ao raio X acidental, ou com aplicação médica (SHANMUGAM *et al.*, 2015).

Outra classe conhecidas de polifenóis com carga negativa são os ácidos fenólicos (benzóico e ácidos hidroxiciâmicos), derivados dos estilbeno (resveratrol), flavan-3 óis (catequina, epicatequina), flavonóis (campferol, quercetina, miricetina), antocianinas entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O resveratrol esta presente principalmente em uvas e produtos derivados desta fruta. Uvas pretas (*Vitis vinifera*) possuem grandes fontes de compostos fenólicos. Os polifenóis presentes na uva

contêm compostos simples chamados de monômeros e substâncias do tipo tanino complexos (oligômeros e polímeros).

O resveratrol é um composto classificado como polifenólico não flavonóide sendo considerada uma fitoalexina. Nas plantas são encontradas em duas formas isômeras: trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). A forma trans além de ser convertida para cis-resveratrol na presença de luz visível está associada aos benefícios á saúde (XI CHU *et al.*, 2015).O resveratrol apresenta diversas ações biológicas importantes para prevenção de doenças como diabetes, antioxidantes, antiinflamatória, anti-tumoral e cardioprotetor (BALATA *et al.*, 2010).

Devido aos benefícios da uva para saúde, o consumo de suco de uva aumentou no Brasil. Em 2014 foram comercializado aproximadamente 90 milhões de litros de suco de uva, 13,5% acima do ano anterior (CANAL RURAL, 2015).

Com o aumento do consumo desta bebida, o Instituto Brasileiro do vinho (Ibravin) encomendou um estudo sobre o mercado consumidor de suco de uva integral através de dados coletados nas praças de Porto Alegre, São Paulo, Rio de Janeiro e Recife em 2015, e o resultado obtido foi que os motivos que levam a população ao consumir este suco é o interesse pelo consumidor por alimentos saudáveis (CANAL RURAL, 2015).Este aumento do consumo pode suco de uva pode também provocar alterações na composição das proteínas salivares e conseqüentemente da película dental adquirida do esmalte alterando a suscetibilidade individual a doenças bucais.

As interações de polifenóis e proteínas salivares vêm sendo estudas e serão descritas a seguir.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO

A saliva total estimulada foi coletada de voluntários da pesquisa que foram recrutados de acordo com os critérios de inclusão. As salivas foram agrupadas formando um *pool* de saliva total que foi utilizada para os experimentos.

4.2. ASPÉCTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética Universidade Federal do Paraná com o parecer número 888.649 18/11/2014 (Anexo 1).

4.3. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Os objetivos da pesquisa foram esclarecidos aos participantes via e-mail para recrutamento e pessoalmente após a seleção. Cinco participantes com idade entre 23 a 32 anos foram selecionados, entre os alunos de graduação e pós-graduação que realizavam atividades de pesquisa no Depto de Bioquímica e Biologia Molecular-UFPR e que não estivessem usando medicamentos. As eventuais dúvidas foram esclarecidas pessoalmente pela equipe da pesquisa. Após concordarem em participar do estudo, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.4. COLETA SALIVA TOTAL

A coleta de saliva estimulada foi realizada pelo método de *splitting*. Os participantes receberam um pedaço de parafina para mastigar. A saliva formada no primeiro minuto foi descartada. Em seguida, os participantes coletaram de 10 a 20 mL de saliva. O *pool* de saliva foi centrifugado por 10 minutos a 14000rpm a 4°C e em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado a -4°C.

4.5. POLIFENÓIS SELECIONADOS

As amostras dos polifenóis foram adquiridas comercialmente da SIGMA ou Chromadex. Os polifenóis utilizados neste estudo foram: (-) epicatequina; (-) epigallocatequina; galato (-) epigallocatequina e resveratrol.

4.6. INTERAÇÃO DOS POLIFENÓIS COM PROTEÍNAS SALIVARES EM SOLUÇÃO

4.6.1. Determinação de alterações dos perfis proteicos do *pool* salivar em presença dos polifenóis

O *pool* de saliva foi incubado por 2 minutos a 37°C com 500 µg/µL dos polifenóis selecionados conforme descrito por HARA *et al.*, (2012). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi separado do precipitado. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensão em 20 µL de água e foi aplicado juntamente com o sobrenadante em SDS-PAGE 12% para avaliar o perfil proteico do *pool* salivar na ausência e presença dos polifenóis

4.6.2. Efeito dos polifenóis na estrutura das proteínas salivares

O *pool* de saliva foi diluída 1:5 com tampão fosfato de sódio 10 mmol/L pH 7,0 e 25 mmol/L de NaCl (3 mL) e em seguida misturada com concentrações crescentes de cada um dos polifenóis. A cada adição de polifenol o espectro emissão de fluorescência de 300 a 500 nm das proteínas salivares com excitação em 282 nm foram coletados. Os espectros analisados e o efeito dos polifenóis na supressão da fluorescência do triptofano e o tipo de interação dos polifenóis com as proteínas salivares foram determinadas a partir do gráfico de Stern-Volmer (SOARES, MATEUS e FREITAS, 2007; XIAO *et al.*, 2011)

4.6.3. Efeito dos polifenóis na atividade α -amilase salivar

Para a avaliação da atividade da α -amilase salivar foi usado o Kit Labtest e 100 µL do *pool* de saliva foram misturados com o amido (substrato), conforme as instruções do fabricante. A diminuição da intensidade da cor azul, após a adição do

iodo foi comparada com o controle e é proporcional a atividade da α -amilase. Os polifenóis foram adicionados ao substrato e amostras de saliva nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 mmol/L para avaliar o efeitos destes compostos sobre a atividade da enzima. Cubeta de 1cm óptico foi usada para mensuração da absorbância em 660nm, após incubação de 7 minutos e 30 segundo cronometrados. Os cálculos de atividade foram realizados conforme as especificações do fabricante.

4.7. MÉTODOS GERAIS

4.7.1. Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína das amostras de saliva foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O padrão de proteína utilizado foi soro albumina bovina.

4.7.2. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes

As condições de eletroforese desnaturante (SDS – PAGE) foram realizadas como descritas por LAEMMLI (1970). A coloração do gel foi realizada com *comassie blue* (BRADFORD, 1976), com prata ou com *Coomassie R-250* coloidal, conforme descrito por Chaves (2004).

4.8. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA

Os espectros de fluorescência foram obtidos por Jasco fluorímetro FP-6500. O *pool* de saliva foi transferido para uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico usado para mensuração. A supressão da fluorescência foi plotada como intensidade de fluorescência relativa expressa por $(RFI=F/F_0 \times 100)$, no qual as intensidades de emissões das amostras contendo concentrações crescentes de polifenóis foram divididas pela intensidade de emissão da amostra controle multiplicada por 100, contra as concentrações de polifenol. Para o cálculo da constante de supressão, os dados plotados foram com um *plot* de Stern-Volmer expresso por F_0/F , em que a intensidade da emissão da amostra controle é dividida pelas intensidades das emissões do *pool* com concentrações crescentes dos

polifenóis contra concentração dos polifenóis. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A supressão da fluorescência foi descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + k_{SV}[Q]$$

Onde, F_0 e F são representados como fluorescência antes e depois da adição dos polifenóis respectivamente, k_q representa a constante biomolecular e τ_0 é o tempo de meia vida do fluoróforo na ausência do supressor, $[Q]$ é definido como concentração de polifenol e k_{sv} é a constante de Stern-Volmer obtida por regressão linear do plot F_0/F contra concentração de polifeno. Quando um *plot* linear é observado, geralmente indica que os fluoróforos foram acessíveis ao supressor. Em alguns casos, o fluoróforo pode sofrer supressão por cinética dinâmica ou colisional e, neste caso, ocorre somente colisão entre fluoróforo e supressor sem formação de complexos. O mecanismo estático é aquele em que há formação de complexos entre os dois elementos. Outra possibilidade é a presença de ambos os mecanismos no processo de supressão. Neste tipo de cinética, ao plotar o gráfico de Stern-Volmer, observa-se uma curvatura côncava em direção ao eixo y do gráfico contra a concentração de polifenóis (Figura 2). Nestas condições F/F_0 contra $[Q]$ é expresso pela fórmula de Stern-Volmer modificada:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q](1 + k_s)[Q]$$

K_D representa constate de supressão dinâmica e K_s estático (PAPADOPOULOU, GREEN e FRAZIER, 2005).

Stern-volmer

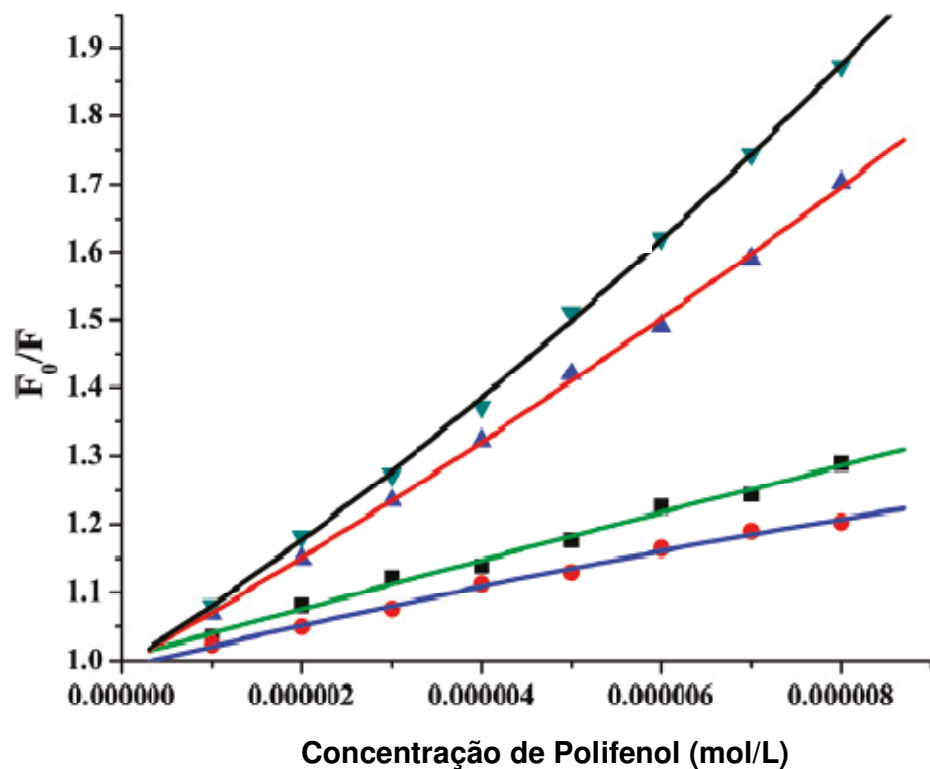


FIGURA 2 – CINÉTICAS ENCONTRADAS NO PLOT DE STERN-VOLMER
FONTE: ADAPTADO DE XIAO, J. *et al.*,(2011)

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DOS POLIFENOIS SOBRE PROTEÍNAS SALIVARES

Neste trabalho o efeito dos polifenóis resveratrol, epigallocatequina-galato, epigallocatequina e ácido gálico sobre as proteínas salivares foram estudados. Inicialmente, os polifenóis foram individualmente incubados com saliva e em seguida, a amostra foi centrifugada para verificar através do perfil protéico do precipitado e do sobrenadante a possibilidade de interação dos polifenóis e proteínas salivares, conforme descrito por Hara *et al.* (2012).

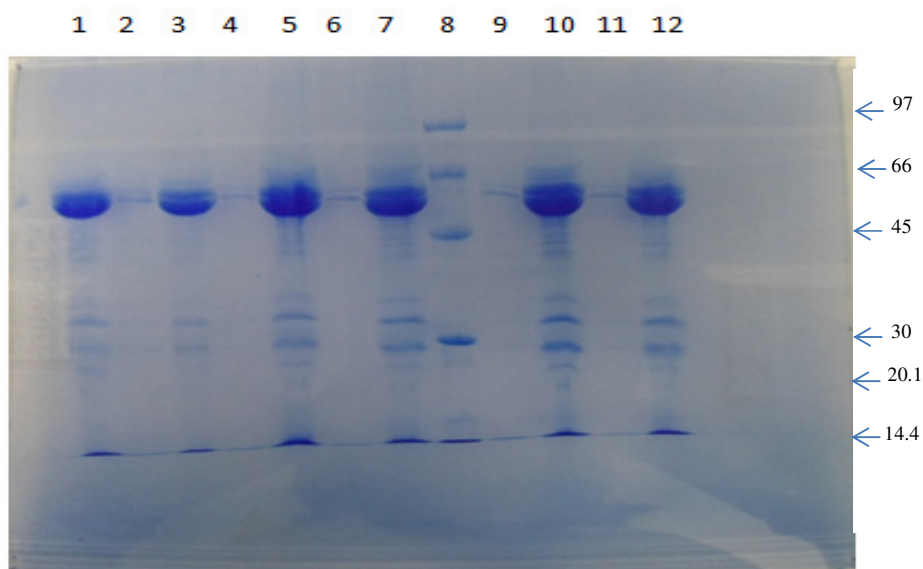


FIGURA 3 – PERFIL ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENOIS: Linha 1 - saliva; Linha 2 - precipitado saliva:etanol/água (controle) – Linha 3 - sobrenadante – saliva:etanol/água; Linha 4 - precipitado - saliva:epigallocatequina; - Linha 5 - sobrenadante -saliva:epigallocatequina; Linha 6 - precipitado – saliva:epigallocatequina-galato; Linha 7 - sobrenadante – saliva:epigallocatequina-galato; Linha 8- Marcador baixo peso molecular;Linha 9 - Precipitado saliva:resveratrol;Linha 10-sobrenadante saliva:resveratrol; Linha 11- precipitado saliva ácido gálico; Linha 12-sobrenadante saliva:ácido gálico.

A figura 3 mostra o perfil protéico do precipitado e do sobrenadante das misturas saliva e polifenóis. Como observado a maior parte das proteínas permaneceram no sobrenadante. O perfil proteico da saliva total (controle) e saliva total em presença de polifenóis foram semelhantes sugerindo que SDS-PAGE não foi sensível o suficiente para detectar este tipo de interação. Entretanto, a

coloração do gel com *comassie* coloidal ou prata também não mostrou aumento no número de bandas.

Um experimento usando epigalocatequina-galato dissolvida em água pH 2,7, foi realizado para procurar reproduzir os resultados observados por Hara *et al.* (2012) que observaram maior quantidade de proteínas salivares precipitadas em presença de epigalocatequina-galato dissolvida neste sistema.

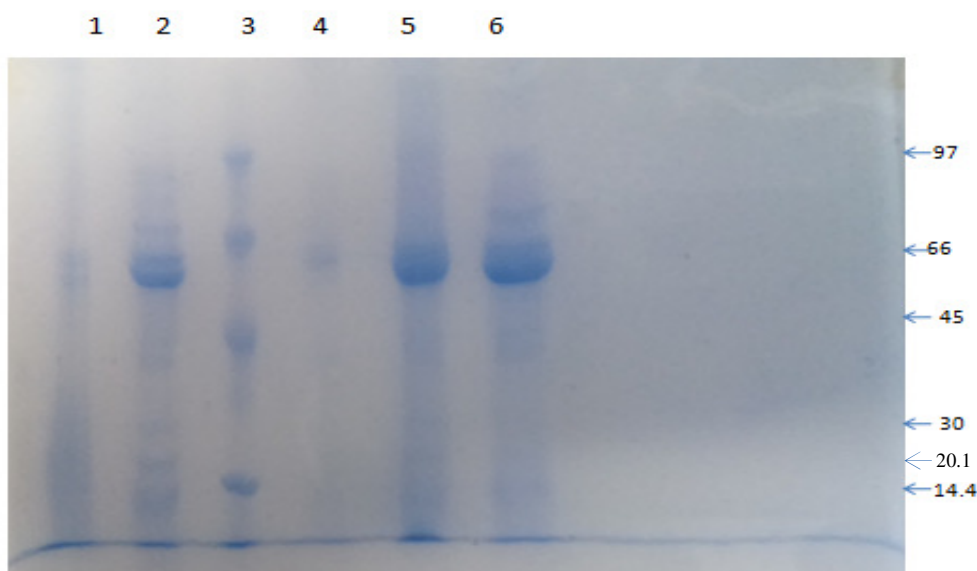


FIGURA 4 – PERFIL ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENÓIS. Linha 1 - precipitado água (controle) – Linha 2- sobrenadante – saliva:etanol/água; - Linha 3- Marcador baixo peso molecular; Linha 4 - precipitado saliva:EGCG; Linha 5- sobrenadante -saliva:EGCG; Linha 6 – Saliva.

A figura 4 mostra que utilizando água pH 2,7 para dissolver a epigalocatequina-galato proteínas da saliva total (controle) precipitam. Estes resultados diferem dos observados por HARA *et al.* (2012) mas mesmas condições.

Assim, passamos a utilizar a supressão da fluorescência do triptofano para avaliar a interação dos polifenóis e as proteínas salivares.

As Figura 5 A, B, C e D mostram os espectros de emissão da fluorescência na região de 300 a 500 nm, com excitação em 282 nm das amostras de *pool* de saliva total (2,0 mg/mL de proteínas) em presença de concentrações crescentes de polifenóis. O perfil de emissão do ácido gálico não foi alterado com o aumento da concentração deste polifenol (Figura 5 D). Já em presença de resveratrol, epigalocatequina-galato e epigalocatequina houve um descrésimo da intensidade da fluorescência emitida pelo triptofano (Figura 5 A, B e C). Além disso, foi observado

deslocamento das curvas para o vermelho a partir de 53 mM de resveratrol com o surgimento de um novo pico em 404 nm (figura 5A).

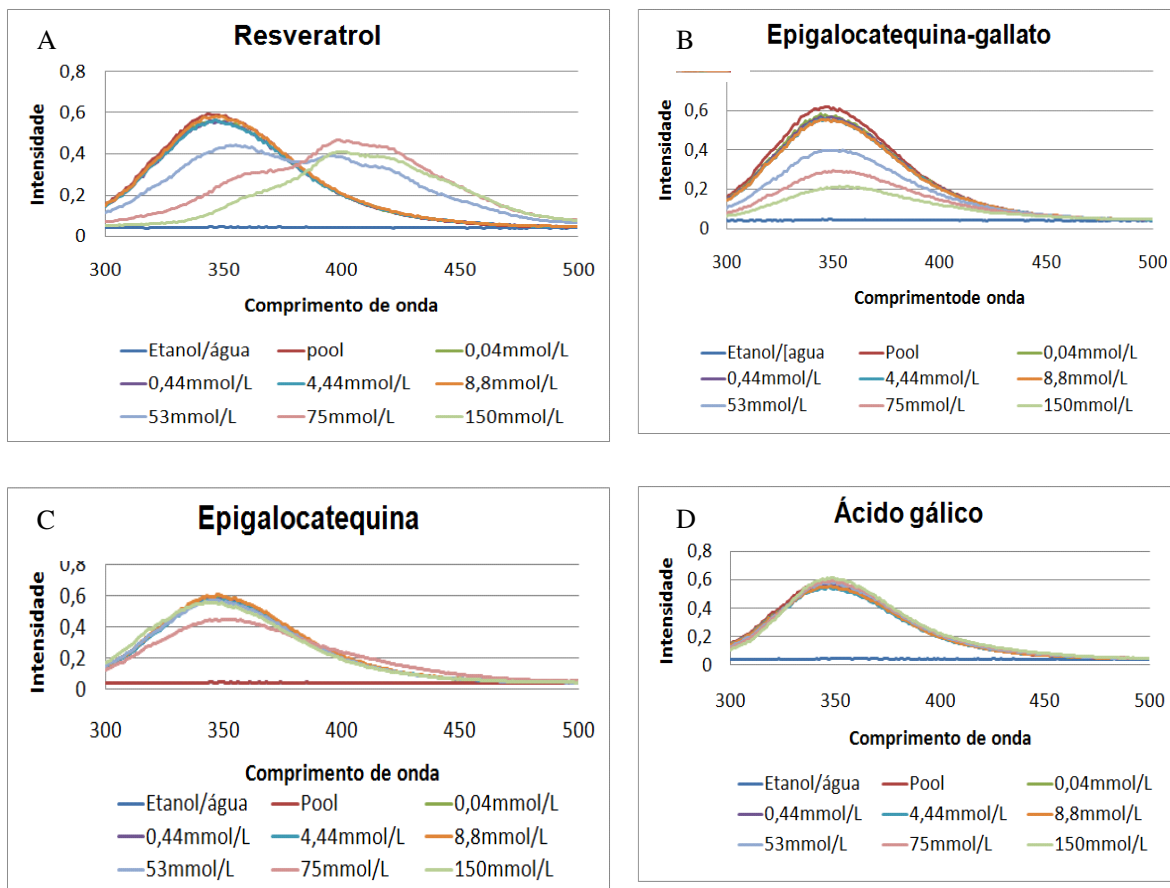


FIGURA 5 – ESPECTROS DE EMISSÃO DO TRIPTOFANO COM EXCITAÇÃO DE 282 nm NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIFENÓIS. (a) resveratrol, (b) epigallocatequina-gallato, (c) epigallocatequina e (d) ácido gálico (n = 3).

A origem do pico em 404 nm observado em presença de altas concentrações de resveratrol foi investigada. Um novo experimento foi realizado titulando o tampão com as mesmas concentrações de resveratrol (espectros controle) utilizadas nos experimentos de interação com o *pool* de saliva total. Os espectros de emissão controle foram subtraídos dos espectros de interação saliva e resveratrol (Figura 6). Os resultados mostraram que o pico em 404 nm desapareceu, sugerindo que este pico é devido a emissão do resveratrol.

Assim, para determinação dos demais parâmetros para as amostras de saliva em presença de resveratrol os espectros de subtração foram utilizados. Conforme observado na figura 6 após subtração dos espectros apenas o efeito do resveratrol

sobre o pico de emissão do triptofano é visualizado.

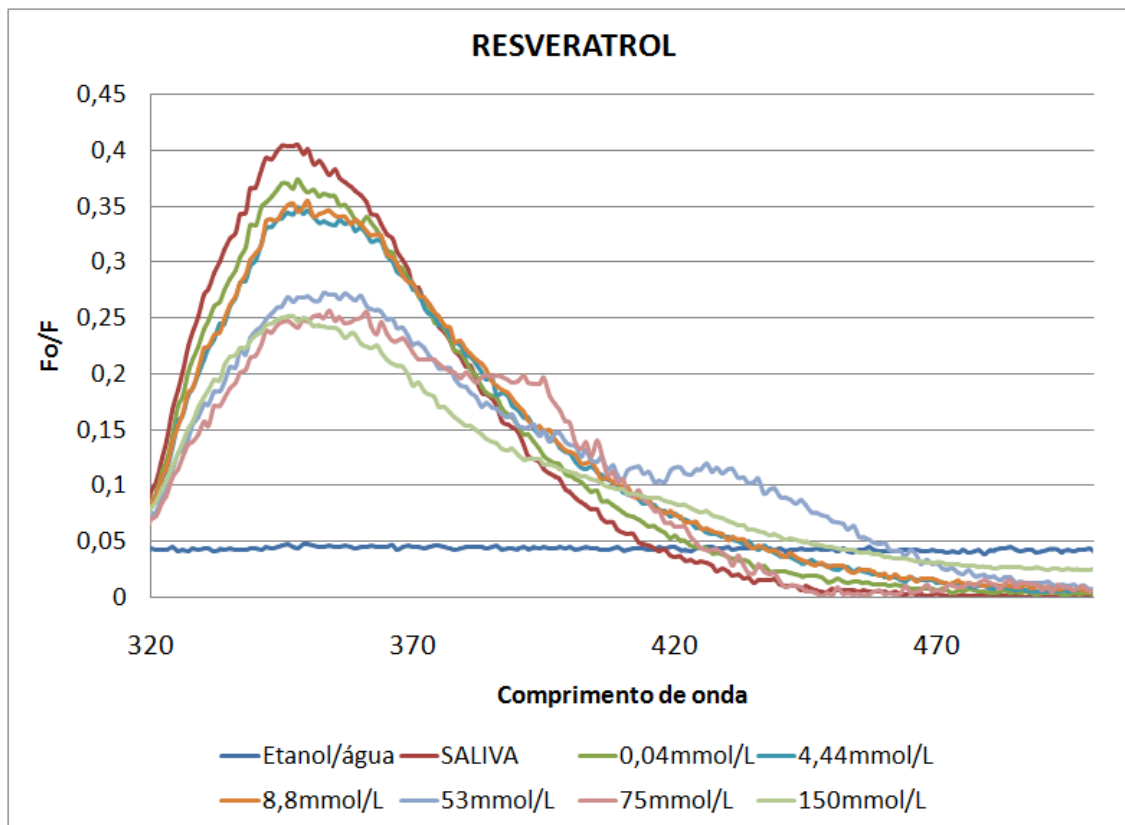


FIGURA 6– ESPECTRO DA SUBTRAÇÃO DE EMISSÃO DO TRIPTOFANO DAS PROTEÍNAS SALIVARES EM PRESENÇA DE RESVERATROL. Os espectros foram obtidos pela subtração espectro de emissão do triptofano em excitação de 282 nm do controle (tampão e resveratrol) e saliva-resveratrol. Os espectro apresentados correspondem a média de triplicatas.

5.2. SUPRESSÃO FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO PROTEÍNAS SALIVARES

A Figura 7 mostra a supressão da fluorescência do triptofano com a adição dos polifenóis resveratrol, epigallocatequina-galato, epigallocatequina e ácido gálico. A epigallocatequina-galato apresentou supressão da emissão do triptofano de 65,68%. Já resveratrol e epigallocatequina apresentaram 38,15% e 17,89% na concentração de 150 mmol/L de polifenol e em presença de ácido gálico não foram observadas alterações no espectro de emissão do triptofano.

Diferenças na capacidade de supressão entre os polifenóis mostram que o ambiente do triptofano pode sofrer alterações conforme a estrutura do polifenol. O quadro 3 mostra a diferenças estruturais entre esses polifenóis.

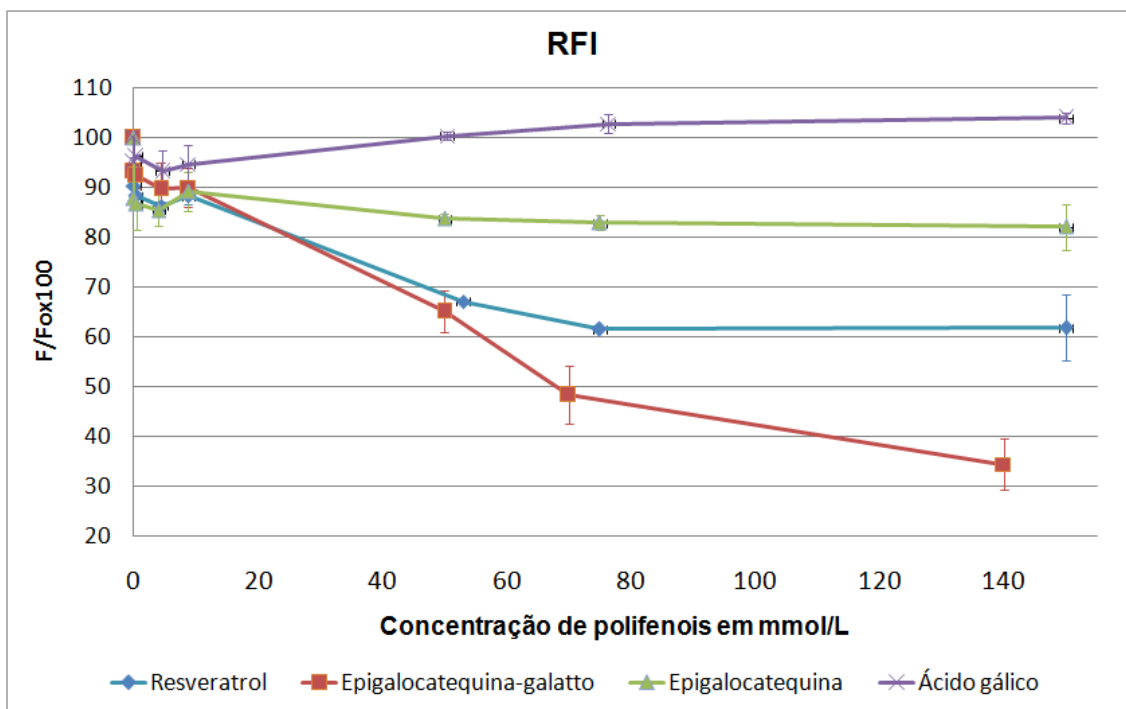
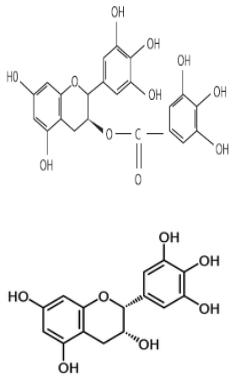
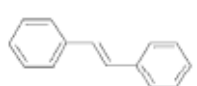
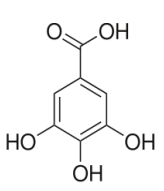


FIGURA 7– INTENSIDADE RELATIVA DA FLUORESCÊNCIA (RFI) EMITIDA PELO TRIPTOFANO PARA O *POOL* DE SALIVA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE POLIFENÓIS. ($RFI = F/F_{ox100}$) contra concentrações de polifenóis resveratrol. A intensidade da emissão da fluorescência do triptofano foi obtida em excitação de 282nm e emissão máxima em 350nm (n = 3).

SUBCLASSE	POLIFENOL	SUBSTITUIÇÃO		
		OH	OCH3	Outros
Flavanonol 	EGCG (2,3)cis EGC (2,3) cis	5,7,3',4',5' 3,5,7,3',4',5'	----- -----	3 galato
Estilbeno 	Resveratrol	3,5,4'	-----	-----
Ácido gálico 	Ácido gálico	-----	-----	R=H

QUADRO 3- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS POLIFENOIS

FONTE: ADAPTADO DE XIAO, J. *et al*, (2011); LAMARÃO e FIALHO, (2009)

5.3. INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS SALIVARES E POLIFENOIS

A análise do gráfico de Stern-Volmer para resveratrol, epigallocatequina-galato, epigallocatequina e ácido gálico (Figura8) sugerem que epigallocatequina-galato apresentaram característica de supressão dinâmica e estática, devido ao aumento da linearidade em direção ao eixo y com a adição de maiores concentrações de epigallocatequina-gallato. Assim, estes polifenóis colidem e complexam com as proteínas salivares. Enquanto, resveratrol, epigallocatequina e

ácido gálico apresentam características lineares, sugerindo que supressor e fluoróforo somente colidiram, sem formação de complexos.

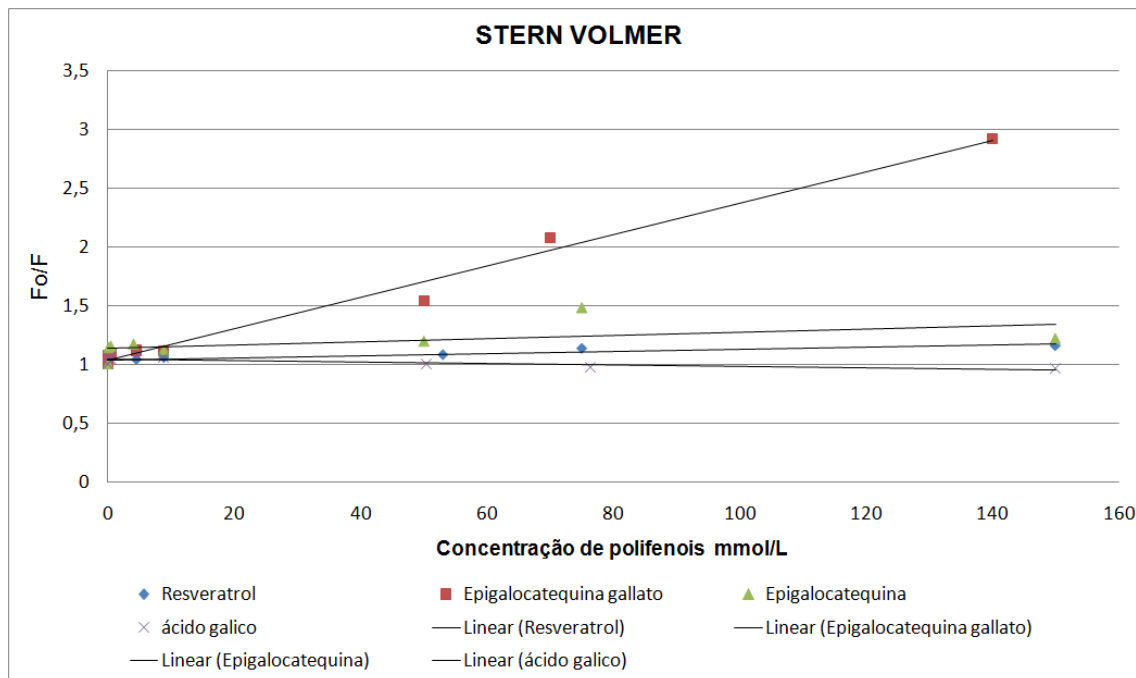


FIGURA 8– GRÁFICOS DE STERN-VOLMER DO *POOL* SALIVAR EM PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE POLIFENOIS. Plot obtido através da divisão das médias das intensidades de emissão da amostra controle (F_0) pelas médias das intensidades de emissão das amostras de *pool* salivar com polifenóis (F), ($n = 3$).

5.4. EFEITO DOS POLIFENOIS NA ATIVIDADE DA α -AMILASE SALIVAR

A figura 9 mostra que a atividade de α -amilase salivar na presença de concentrações crescentes de diferentes polifenóis diminui.

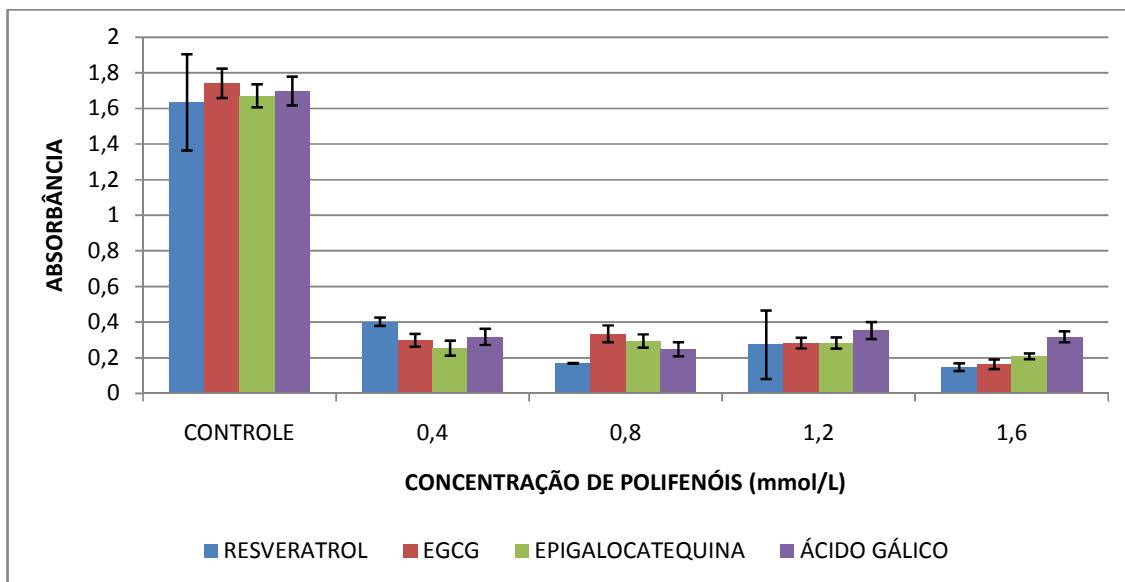


FIGURA 9– ATIVIDADE DA α -AMILASE SALIVAR NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DOS POLIFENÓIS. O efeito dos polifenóis foi avaliado através da adição dos polifenóis (0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 mmol/L) ao pool de saliva total (n = 3).

6. DISCUSSÃO

Este trabalho visava avaliar a interação de proteínas salivares e polifenóis. Para isso foram escolhidos o resveratrol um polifenol comum em uvas e epigallocatequina galato (EGCG) presente em chás. A epigallocatequina seria um precursor não modificado de EGCG e o ácido gálico um polifenol de baixa massa molecular.

Inicialmente, o método utilizado para investigar a possibilidade de interações foi a incubação de polifenóis e o *pool* de saliva total coletada conforme descrito por Hara *et al.* (2012). O perfil eletroforético do precipitado e sobrenanante corado com *comassie blue*, *comassie* coloidal ou prata indicou que não ocorreu interação entre proteínas salivares e polifenóis ou estas interações existem e não foram detectadas pela baixa sensibilidade dos métodos de coloração. Estes resultados foram diferente dos resultados encontrados por Hara *et al.* (2012) que mesmo utilizando coloração com *comassie blue* obtiveram bandas visíveis utilizando a mesma quantidade de proteínas do *pool* salivar (30 µg) e polifenóis (5 mg/mL). Uma provável explicação para este resultado seria que Hara *et al.* (2012) diluiu o epicalocatequina galato, único polifenol estudado por ele, em água pH 2,7. No presente trabalho foram utilizados diferentes polifenóis e o resveratrol foi o que apresentou menor solubilidade em água. Assim, o etanol 50% foi utilizado como veículo para diluição dos polifenóis. Os autores que estudaram interação do resveratrol e outras proteínas na maioria das vezes utilizaram DMSO (PAPADOPOULO, GREEN E FRAZIER, 2005; ZYCOVA *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2015), outros metanol (SOARES, MATEUS E FREITAS 2007; XIAO *et al.*, 2011; Nair, 2015), etanol (JOYE *et al.*, 2015; MOHAMMADI E MOEENI, 2015; ZARYCHTA, GIANOPOULOS E PINKERTON, 2016) ou etanol 50% em 10 mM Tris/HCL pH 7,4 (BOURASSA *et al.*, 2010). A solubilidade do resveratrol é 0,000003mg/mL em água e 50 mg/L em etanol (NEMEN e SENNA, 2011), do ácido gálico é 0,5 g/100ml em água (EMBRAPA, 2009) e da EGCG é 5 mg/ml em água (SHIXIAN *et al.*, 2006).

Hara *et al.* (2012) utilizaram água pH 2,7 para solubilizar EGCG e nestas condições observaram a formação de precipitado ao incubarem o polifenol e saliva. A fim de reproduzir estes resultados, o mesmo experimento utilizando água com pH 2,7 como solvente de epigallocatequina-galato foi realizado. Entretanto, ocorreu a formação de precipitado na amostra controle, diferente do observado por Hara *et*

al.(2012). Neste estudo o pH final das misturas de *pool* salivar e epigallocatequina-galato em água pH 2,7 foi 7, o que não justificaria a formação de precipitado pela variação do pH.

Assim, devido as dificuldades de estudar a interação saliva polifenóis observando o perfil proteico por SDS-PAGE, a técnica de supressão de fluorescência do triptofano foi usada. Estes estudos são importantes para a determinar o tipo de interação entre fluoróforo e supressor.

A análise do perfil de emissão do triptofano do *pool* de saliva total em presença dos diferentes polifenóis mostrou que o ácido gálico não interfere no perfil de emissão do triptofano sugerindo que este polifenol não forma complexos com as proteínas salivares. A estrutura do polifenol parece determinar o nível de interação entre polifenol e proteínas salivares. Xiao *et al.* (2011) observaram que a constante de afinidade de polifenóis com as proteínas comuns do plasma humano é fortemente influenciada pelas diferenças estruturais dos plifenóis da dieta. Epigallocatequina-galato e epigallocatequina são polifenóis da subclasse dos flavanonol. Entretanto, a presença do galato aumenta a capacidade do polifenol de interferir no perfil de emissão do triptofano e muda a cinética de interação para estática sugerindo que epigallocatequina-galato forma complexos com o *pool* de proteínas salivares. Já epigallocatequina e resveratrol interferem menos no perfil de emissão do triptofano e apresentaram cinética dinâmica, sugerindo que as interações destes polifenóis e proteínas salivares seriam apenas colisionais.

No espectro de fluorescência das proteínas salivares em presença de altas concentrações de resveratrol foi observado o aparecimento de um pico de emissão na região de 404 nm. Este pico é atribuído à emissão do resveratrol e apareceu com o aumento da concentração de resveratrol no sistema Este fenômeno ocorre pela associação de moléculas de resveratrol da solução pela interação hidrofóbica dos anéis fenólicos. O pico de emissão do resveratrol aparece no início do processo e a auto supressão aparece no fim do processo devido a associação das moléculas de resveratrol (ZHANG ., 2012). Para omitir da emissão do resveratrol nestes espectros foi realizada a subtração dos espectros das amostras de saliva-resveratrol dos espectros obtidos para tampão-resveratrol (controle).

O efeito do resveratrol sobre o *pool* de proteínas salivares ou proteínas salivares isoladas ainda não havia sido investigado. Em soro albumina bovina foi observada uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência do triptofano

em presença do resveratrol evidenciado pelo deslocamento do espectro para o vermelho com o aumento das concentrações de resveratrol (10 a 100 μ mol/L) e redução na quantidade de α -hélice e um aumento da folha β na proteína (BOURASSA *et al.*, 2010). Nair (2015) verificou que o resveratrol apresentou mecanismo estático de supressão da emissão do triptofano do soro albumina bovino. Latrufe *et al.*(2014) também verificaram que vários polifenóis interagem com soro albumina bovina entre eles resveratrol e epigallocatequina. Entretanto, o resveratrol foi o único que apresentou dois sítios de ligação à proteína e provocou pequenas alterações conformacionais. As interações entre trans-resveratrol com α -lactoalbumina bovina também são fortes, sugerindo que a incorporação do resveratrol no leite pode ser uma fonte nutritiva deste polifenol (MOHAMMADI e MOEENI, 2015). O resveratrol interagem com proteínas do trigo, como zeína e gliadina de forma diferente. Com a zeína a interação ocorre por ligações de hidrogênio e por mecanismo dinâmico e com gliadina através de interações hidrofóbicas por mecanismos estáticos e dinâmicos (JOYE *et al.*, 2015). No presente trabalho, a análise da cinética de Stern-Volmer mostrou que o resveratrol alterou o perfil de emissão do triptofano por colidir com proteínas salivares, sem formar complexo com estas proteínas. Estes resultados diferem dos obtidos pelos autores acima citados provavelmente porque aqueles trabalharam com proteínas pura para avaliar interação do resveratrol-proteína, o que pode facilitar a acessibilidade da molécula do polifenol à proteína. Enquanto que na saliva total há uma mistura de proteínas que poderia dificultar a interação entre polifenóis e proteínas salivares.

A epigallocatequina-galato foi capaz de suprimir em 20 a 30% o sinal de emissão do triptofano da α -amilase salivar (SOARES, MATEUS e FREITAS, 2007). Neste estudo, apesar de trabalharmos com *pool* salivar a epigallocatequina galato foi capaz de atenuar em 65% o sinal de emissão do triptofano. Como aqueles autores realizaram os experimentos em pH 5, isso pode ter interferido no perfil de supressão do sinal de emissão do triptofano.

Proteínas do sangue humano como hemoglobina e albumina sérica também interagem com epigallocatequina-galato (OZYURT, LUNA e ESTÉVEZ, 2015) promovendo redução na intensidade de fluorescência do triptofano observadas foram 63% e 80% para hemoglobina e albumina sérica, respectivamente.

YAO *et al.* (2011) utilizaram saliva total e a saliva da parótida para verificar a interação de proteínas e EGCG e observaram redução da fluorescência em 55%, cinética estática e ausência de deslocamento para ambas as amostras de saliva.

Maiti, Ghosh e Dasgupta (2006) observaram que concentração de 460 $\mu\text{mol/L}$ de epigallocatequina provocavam alterações conformacionais da soro albumina humana, com redução de α -helice de 61% para 49% e a aumento da proporção de folhas β de 29 para 39%.

A epigallocatequina foi capaz de suprimir de 20 a 30% o sinal de emissão do triptofano da soro albumina bovina e não provocou alterações conformacionais na proteína (PAPADOPOULOU *et al.*, 2005). Estes resultados de supressão são semelhantes aos obtidos neste trabalho com epigallocatequina e o *pool* de proteínas salivares.

Zhang *et al.* (2008) observaram que a soro albumina humana pura e ácido gálico interagem e ocorrem modificações conformacionais com a reduções de 54 a 56% α -helices com concentrações entre 1,71 a 9,33 $\mu\text{mol/L}$. Neste estudo, não observamos interação entre ácido gálico e as proteínas salivares provavelmente pela utilização do *pool* de proteínas que dificulta a acessibilidade dos polifenóis as proteínas salivares.

Em Archetti (2014) observou que adição de suco integral e reconstituído de uva a saliva provocou diminuição do espectro de emissão do triptofano, sugerindo que componentes dos sucos interagem com o *pool* de proteínas salivares. Como o resveratrol é um dos polifenóis encontrados no suco de uva, ele pode ter contribuído para o efeito observado.

Neste estudo as concentrações de polifenóis variaram de 0,04 a 150 mmol/L que são superiores ao utilizado na maioria da literatura relacionada. Entretanto, a maioria dos autores trabalhou com proteínas puras na concentração de μmol . Papadopoulou *et al.* (2005) ao estudarem interação da BSA e rutina, quercetina e epigallocatequina utilizaram concentrações que variaram de 0,1 a 38 μmol . Já as concentração de tanino ácido, maldivina-3-glucosil e catequina variaram de 0-25 μm em estudos que analisaram a interação destes polifenóis com BSA e α – amilase salivar (SOARES, MATEUS e FREITAS, 2007). Com o aumento da concentração de EGCG (0,2 a 0,21 $\mu\text{mol/L}$) maior concentração de agregados foram observadas em proteínas ricas em prolina (CANON *et al.*, 2013). Narotzki *et al.* (2012) observaram um aumento da atividade de peroxidase de 280% pela adição de

cháverde, infusões de chá preto (50 µL/mL) e EGCG (50 µmol/L) à saliva. Somente Yao *et al.*(2010) utilizaram saliva total para verificar a adstringência provocada pelo EGCG e neste caso as concentrações (2 mmol/L e 24 mmol/L) foram superiores a utilizadas por autores que trabalharam com proteínas puras.

Neste estudo observamos que na presença de diferentes concentrações dos polifenóis houve redução da atividade de α -amilase salivar. Harshadrai *et al.* (2006) observaram redução da atividade da α -amilase salivar quando incubaram a saliva com concentrações crescentes de taninos que variaram de 0,12 a 1,2 mg/mL. Hara *et al.* (2012) e Fei *et al.*(2014) também observaram redução da atividade da α -amilase salivar ao incubar a enzima pura com polifenóis como epigallocatequina-galato e epigallocatequina. Zhang *et al.* (1998) verificaram que chá verde e preto também reduzem a atividade da α -amilase salivar. A atividade da α -amilase pancreática de porcos também foi fortemente inibida por flavonoides (TADERA *et al.*, 2006). Um flavonóide proveniente da acerola também foi capaz de inibir a atividade da α -amilase salivar humana purificada (KAWAGUCHI *et al.*, 2007). Entretanto, como a α -amilase salivar é uma proteína que liga cálcio (SANTOS *et al.*, 2012) e os taninos formam complexos insolúveis com o cálcio (CALIXTO *et al.*, 1986), pode ser que a redução da atividade observada ocorreu pela baixa disponibilidade de cálcio no sistema e não devido a possíveis alterações conformacionais das proteínas salivares causada pela interação destas proteínas e polifenóis.

Ao comparar os resultados com os dados da literatura alguns pontos importantes precisam ser considerados. A maioria dos estudos utilizou proteínas puras em concentrações inferiores ao *pool* de saliva utilizado neste trabalho. O *pool* de saliva é uma amostra heterogênea de proteínas e por isso foram utilizadas maiores concentrações de proteínas e proporcionalmente maiores concentrações de polifenóis. *in vivo* a primeira frente de contato com os polifenóis são as proteínas salivares. Entretanto, na saliva estas proteínas formam complexos (SOARES *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Estes complexos protegem as proteínas da proteólise para encaminhá-las a diferentes locais da cavidade bucal e modulam a atividade biológica das proteínas (MOFFA *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

Assim, a existência destes complexos proteicos na saliva podem ter protegido a interação e precipitação das proteínas salivares pelos polifenóis investigados. Os resultados mostraram que ácido gálico foi incapaz de interagir com as proteínas salivares, resveratrol e epigallocatequina apenas colidem com as moléculas de proteínas e apenas epigallocatequina-galato pareceu ser capaz de formar complexos com as proteínas salivares em concentrações de polifenóis aproximadamente 1000 vezes superiores as utilizadas por autores que trabalharam com proteínas puras. Estes resultados mostraram que de uma forma geral, os polifenóis analisados neste estudo interagiram de forma branda com as proteínas salivares mesmo quando em altas concentrações. Os polifenóis estudados estão presentes na dieta em pequenas concentrações. Em suco de uva integral as concentrações de resveratrol variam de 0,8 a 3,9 $\mu\text{mol/L}$ e em chá verde a concentração de epigallocatequina-galato é de aproximadamente 2,18 $\mu\text{mol/L}$ (SAUTTER *et al.*, 2005; HASLER, 1998). Como estes valores são inferiores as concentrações utilizadas neste estudo, pode ser que *in vivo* estes polifenóis não sejam capazes que afetar a estrutura e atividade os complexos de proteínas salivares e provavelmente não interferem nos processos de transporte e ligação destas proteínas aos seus alvos.

Biologicamente, estes resultados são importantes pois sugerem que a homeostase é mantida independente da dieta do indivíduo. Se considerarmos que as proteínas da saliva são as precursoras da película e que esta é responsável pela adsorção de microrganismos em condições sacarose independente, o mecanismo de complexação das proteínas salivares é resistente à ação de componentes da dieta, como polifenóis, garantindo a adsorção dos microrganismos residentes do biofilme que mantém a homeostase do organismo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que nas condições estudadas:

- o ácido gálico não interage com as proteínas salivares
- os polifenóis resveratrol e epigallocatequina interagem com as proteínas salivares apenas por colisão
- epigallocatequina galato interage com as proteínas salivares por mecanismos dinâmicos (colisões) e estáticos (formação de complexos)
- a presença dos polifenóis reduz a atividade de α -amilase salivar

REFERÊNCIAS

AMERONGEN,A.; ODERKERK,C.H.;DRIESSEN,A. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization *in vitro*. **Caries Res.** v. 21, p. 297-309, 1987.

AMORIM, A.C.; FERREIRA, P.A.M.;NAVARRO,F. Efeito da epigallocatequina galato do chá verde sobre a redução ponderal, a termogênese e a oxidação lipídica. **Rev Bras Nutr Esp.**, v. 1, p 32-39,2007.

ANDREWS,P.; MARTIN, L. Hominoid dietary evolution. **Philos trans R. Soc Lond B Biol Sci.** V29. pp. 199-209, 1991

ANGELO,M.P., JORGE,N. Phenolic Compounds in foods-a brief review. **Rev. Inst.Adolfo Lutz.**,v.66, n. 1. São Paulo, 2007.

ARCHETTI, B.F. Interferencia dos sucos de uva integral e reconstituída na estrutura das proteínas salivares e da película dental adquirida do esmalte. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.** 2014 (Curitiba. Tese em português. 06/09/2014).

ASSIS,S.J.; LIMA,A.R.;LIMA,M.P.J.;RODRIGUES,A.K.L.;SANTIAGO,L.S.Effect of epigallocatechin-3-gallate application for remaining carious dentin disinfection. **J Conserv Dent.**, v. 18, p. 51-55, 2015.

AZEN, E. A.; LEUTENEGGER, W.; PETERS, E. H. Evolutionary and dietary aspects of salivary basic (Pb) and post Pb (PPb) proteins in anthropoid primates. **Nature**,v.273 p.775-778, 1978.

BALATA,G.F.;ESSA,E.A.;SHAMARDL,H.A.;ZAIDAN,S.H.;ABOUREHAB,M.A.Self-emulsifying drug delivery systems as a tool to improve solubility and bioavailability of resveratrol. **Drug Des Devel Ther.** V 5.P.117-28, 2016.

BANAS,J,A.; VICKERMAN,N.M.: Glucan-binding proteins of oral streptococci.Crit. Ver **Oral. Bio Med.** V14. pp 89-99,2003.

BATISTA, V.R.; MOREIRA, M.A.E.; CORSO,T.C.A. Alimentação, estado nutricional e condição bucal da criança. **Rev. Nutri**, v.20, Março 2007..

BENNICK, A.; YAN, Q. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. **J. Biochem.** v. 311 p. 341-347, 1995.

BOS, R., H. C.; VAN DER MEI, J. M.; MEINDERS, BUSHER, H. J.. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analyses. **J. Microbiol. Methods.**, v. 20, p. 289-305, 1985.

BOURASSA, *et al*, Resveratrol, Genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *J Phys Chem B.* v11.p 3348-54, 2010.

BOWEN WH, KOO H: Biology of Streptococcus mutans -derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res** v.45. p. 69–86, 2011

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.

BRUNO LS, LI X, WANG L, SOARES RV, SIQUEIRA CC, OPPENHEIM FG, *et al*. Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1746, p. 65–72. 2005.

BRUNO. S,L. *et al*,. Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions. **Elsevier**.doi:10.1016/j.bbamcr.2005.08.007, 2005.

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.

CANON *et al*, Agregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCg. **Langmuir** v. 12.p-1926-37, 2013

CHAVES,D.F. Análise proteômica das estirpes selvagens, ntrC- enifA-de *Herbaspirillum seropedicae*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.2004(Curitiba. Tese em português. 08/03/2016

CSERHÁTI, T. SZÓGJT.,M. Role of hydrophobic and hydrophilic forces in peptide-protein interaction: **New Advances**. V 16.pp 1665-173, 1995.

CVITKOVITCH, D. G.; YUNG-HUA, L.; ELLEN, R. P. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections.**J.Clin.Invest.**, Washington, v. 112 (11), p. 1626-1632, 2003.

DAVIES.S,H.ReorganisationoftheSalivaryMucin Network byDietaryComponents: Insights from Green TeaPolyphenols. **PLoS** on.doi: 10.1371,2014.

DAWE,C.; KUBIENIEC,K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition.**Oral Biology**. V.49, p 665-669, 2004

DEMANDA POR SUCO INTEGRAL CRESCE NO BRASIL, **Canal Rural**.Bento Gonçalves (RS). Local: Canal Rural, 16 de fevereiro de 2015.

DEVOLD TG, RYKKE M, ISABEY D, SØRENSEN ES, CHRISTENSEN B, LANGSRUD T et al. *in vitro* studies of adsorption of milk proteins onto tooth enamel.**Int Dairy J**. 2006;16:1013–7.

DODDS, W.M.J & YEH, C.K. Health benefits of saliva: a review. **J Dent**, v 33.p 223-33, 2005.

DUARTE,Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms.**Fems microbiology**.v 257. p. 50 -56, 2006.

EMBRAPA. Protocolo de análises para polpa de açaí: um guia prático de consulta. São Paulo, SP 2009.

FEI,Y.; ZHANG,W.; LIN, D.; WU,C.; LI,M.; ZHAO,Y.; ZENG,X.; ZHANG, F. Clinical parameter and Th related to lymphocytes infiltrating degree of labial salivary gland in primary Sjogren's syndrome. **Clin rheumatol** IV 33.pp 523-529, 2014

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.

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

GIBBINS,H.L.;PROCTOR,G.B.;YAKUBOV,G.E.;WILSON,S.;CARPENTER,G.H, Concentration of salivar protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. **Oral Dis.**,v 20, p. 707-713, 2014.

GIBBONS,R.J.; HAY, D.I. Adsorbed salivar proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. **J Dent Res.**, v.68 p.1303–1307, 1989.

GIBBONS,R.J.;HAY,D.I.;CISAR,,J.O.;CLARK,W.B. Adsorbed salivar proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. **Infect Immun. J Dent Res**, v. 56 p.2990–2993. 1989.

GIACAMAN,R.A.; CONTZEN,M.P.; YURI,J.A.; SANDOVAL-MUÑOZ,C. Anticaries effect of an antioxidant-rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm-demineralization model. **J Appl Microbiol.** V 117.p.846-853. 2014

GREGORIO, R.M.; MATEUS, N.; FREITAS,V. Rapid Screening and Identification of New Soluble Tannin–Salivary Protein Aggregates in Saliva by Mass Spectrometry (MALDI-TOF-TOF and FIA-ESI-MS). **American Chemical Society.** v. 30, p. 8528-8537, 2014.

HAFFAJEE AD, TELES RP, SOCRANSKY SS. The effects of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. **Periodontal**, v 42.p 219-258, 2000

HAGERMAN AE, BUTLER LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J Biol Chem.** May 10;256(9):4494–4497, 1981

HANNIG C, HANNIG M, ATTIN T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. **Eur J Oral Sci**;v, 113 n.1. p.2-13. 2005

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

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, C.; KIRSCH, J.; AL-AHMAD, A.; KENSCHKE, 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.; 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.

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

HANNIG, M.; FIEBIGER, M.; GUNTZER, M.; DOBERT, A.; ZIMEHL, R.; NEKRASHEVYCH, Y. Protective effect of the *in situ* formed short-term salivary pellicle. **Arch of Biol.** v.49, p.903-910, 2004

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.

HARA, K.; OHARA, M.; HAYASHI, I.; HINO, T.; NISHIMURA, R.; IWASAKI, Y.; OGAWA, T.; OHYAMA, Y.; SUGIYAMA, M.; AMANO, H. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechingallate precipitates salivary proteins including alpha-amylase: biochemical implications for oral health. **Eur J Oral Sci.**, v.120, p.132-9, 2012.

HAUKIOJA A, LOIMARANTA V, TENOVUO J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion *in vitro*. **Oral Microbiol Immunol**, V 23, P 336–343.

HAY DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. **Arch Oral Biol**.1973;18(12):1517-29

HEMINGWAY, CA, WHITE AJ, SHELLIS RP, ADDY, M, PARKER DM, BARBOUR ME. Enamel erosion in dietary acids: Inhibition by food proteins in vitro. **Caries Res** v. 44.p 525-30,2010).

HIGDON,J.V.; FREI,B.; Teacatechinsandpolyphenols: healtheffects, metabolism, and antioxidant functions.Crit Ver **FodSciNutr** v43 n1, p 89-143, 2003.

HIRASAWA,M.TAKADA,K.OTAKE.S.Inhibition of Acid Production in Dental Plaque Bacteria by Green Tea Catechins.**Caries Res**. v40 pp 265-270,2006.

JANG, A.Y.; LEE, J.K.; SHIN, J.Y.; LEE, H.Y. Association between Smoking and periodontal disease in Korean adults: The fifth korea national health and nutrition examination survey (2010 e 2012). **Korean J. Farm Med**.V 37.p 117-122, 2016

JENKINS,D.J.;KENDALL,C.W.;POPOVICH,D.G.;VIDGEN,E.;MEHLING,C.C,VUKSAN,V.;RANSOM,T.P.;RAO,A.V.;ROSENBERG,Z.R.;TARIQ,N.;COREY,P.;JONES,P.J.;RAEINI,M.;STORY,J.A.;FURUMOYO,E.J.;LLINGWORTH,D.R.;PAPPU,A.S.;CONNELLY,P.W.Effect of a very-high-fiber vegetable,fruit and nut diet on serum lipids and colonic function. **Metabolism** v. 50. P.494-503, 2001

JENKINSON HF, LAMONT RJ. Oral microbial communities in sickness and in health.**Trends Microbiol**v 13. P 589-595, 2005

JENSEN, J.L.; LAMKIN, M.S.; OPPENHEIN, F.G. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. **J. Dent Res.** V 7. pp 1569-1576, 1992

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. .

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.; MULLER, D.; ELOFSSON, U.M.; MALMSTEN, 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.

JOYE, I.J.; PARDO, D.G.; LUDESCHER, R.D.; MCCLEMENTS, D.J. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadina: Toward a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins v 185. P-261-267, 2015.

KAUFMAN, E.; LAMSTER. The diagnostic application of saliva—a review. **Crit. Rev Oral Biol Med.**, v. 13, p 197-212, 2002.

KODOVAZENITIS, G.; PITSAVOS, C.; PAPADIMITRIOU, L.; DELIARGYRIS, N.E.; VROTSOS, I.; STEFANADIS, C.; MADIANOS, N.P. Periodontal disease is associated with higher levels of C-reactive protein in non-diabetic, non-smoking acute myocardial infarction patients. **Elsevier.** v39, p 849- 854, 2011

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

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 54, p. 413-437, 2000

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 42, p. 627-656, 1998.

KOLENBRANDER, P. E; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, Bethesda, v. 175, p. 3247-3252, 1993.

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

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7.**Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970

LAMARÃO, R. da C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 2, 2009.

LAMKIN,M.S.; ARANCILLO,A.A.; OPPENHEIN,F.G. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. **J. Dent Res**. V 75.pp 803-808, 1996.

LEE,H.Y.;WONG,T.D. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009. V. 22, p 241-248, 2009.

LEITES, R.B.C.A.; PINTO, B.M.; SOUSA ,R.E. Aspectosmicrobiológicos das cárie dental. *Salusvita.*,Bauru,v.25,p 135-148, 2006.

LEMONS, J. A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses.**Curr Issues Mol. Biol.**, Washington, v.7, p. 95-108, 2005.

LENDEMANN,U.; GROGAN,J.; & OPPENHEIM,F.G. Salivaand dental pellicle-A Review. **AdvDent Res**. v 14.p22-28, 2000.

Li Q. S., Zhang L., Yang D. Z., Chunjie Z. Contribution of phenolics and essential oils to the antioxidant and antimicrobial properties of *Disporopsis pernyi* (Hua) **diels. Journal of Medicinal Food**. ;v.17. p.714–722, 2014

LIGTNBERG, M.J.; ANTON.; BRAND, S.H.; PETRA, A.M.; KEIJBUS DEN VAN.; VEERMAN, I.C. ENNO. Archives oral biology. V 60.p 1639-1640, 2015

LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen., v. 9, p. 1-11, 1985.

LOO, A.J.; YAN, W.; RAMACHANDRAN, P.; WONG, D.T. Comparative human salivary and plasma proteomes. **J Dent Res** V 89 p.1016-1023, 2010

LJUNGBERG, G.; ERICSON, T.; EKBLAN, B.; BIRKHED, D. Saliva and marathon running. **Scand J. Med, Sci sport.** v 7. P. 214-219, 2015

LOPÉZ, M.L.M.; CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURGOS-MORÓN, E.; AUSTIN, C.A. Green tea constituents (-) epigallocatechin-3 gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydroxyl peroxidase. **Mutagenesis.** v 26. pp 489-498, 2011.

LU, Y.; BENNICK, A. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. **Arch Oral Biol.** V 43. pp. 717-728.

MAITI, K.T.; GHOSH, S.K.; DASGUPTA, S. Interaction of (-) Epigallocatechin-3-Gallate with human serum albumin: Fluorescence, Fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. **Wiley-Liss.** v 64. Pp 355-362

MANACH, C. DONOVAN, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free radical res.** v 38. pp. 771-85, 2004

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v 79. pp 727-47, 2004

MARSH, P. D. Dental plaque. In: LAPPIN-SCOTT, H. M and COSTERTON, J. W. (Ed.). **Bacterial Biofilms.** Cambridge, Cambridge University Press, 1995. p. 282.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 8, p. 263, 1985.

MARUYAMA, K.; SATO, S. Effect of high-glucose conditions on human periodontal ligament endothelial cells: in vitro analysis. **Odontology**. p 1-8, 2016

MARSH, P.D. MICROBIALECOLOGYOF DENTAL PLAQUE AND ITS SIGNIFICANCE IN HEALTHANDDISEASE.**ADV DENT RES**, 1985. pg 263–27, 1985..

MARSH. Dental plaque as a biofilm and microbial community-implication for health and disease. **BMC Oral Health** 6 (Suppl1):S14. DOI 10.1186/1472-6831-6-s1-s14,2006

MATSUBARA, S.; AMAYA, R.B.D. Teores de catequinas e Teoflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.26.p401-407,2006

MCDONALD, E.E.; GOLDBERG, H.A.; TABBARA, N.; MENDES, F.M.; SIQUEIRA, W.L.; Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. **J Dent Res**. v 90. pp.268-272,2011

MEHANSHO, H.; CLEMENTS, S.; SHEARES, B.T.; SMITH, S.; CARLSON, D.M. Inhibition of proline rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and tannin. **The journal of biological chemistry**. V 260. pp 4418-4423, 1985

MOFFA EB, MACHADO MAAM, MUSSI MCM, XIAO Y, GARRIDO SS, GIAMPAOLO ET, et al. *in vitro* Identification of Histatin 5 Salivary Complexes. **PLoS ONE** 10, p. 1-13, 2015

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking **Science and Engineering** v 50. p.358-366

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.; AGUIAR, L.A.. AÇÃO ANTIOXIDANTE DE CHÁS E CONDIMENTOS DE GRANDE CONSUMO NO BRASIL. **Rev Bras, Farmacologia**, v 19, pg 315-320, 2009.

MUHAMMAD,S.; SHERRY,L.; RAJENDRAN,R.; EDWARDS,A.C.;COMBET,E.; RAMAGE,G. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. **Elsivier**.V.44. p.269-273, 2014.

NAIR,S.M. Spectroscopic study on the interaction of resveratrol and pterostilbene

NAURATO N, WONG P, LU Y, WROBLEWSKI K, BENNICK A. Interaction of tannin with human salivary histatins. **J Agric Food Chem**v. 47 p.2229-2234, 1999.

NEMEN. D.; SENNA, E.L. Preparation and characterization of resveratrol-loaded lipid-based nanocarriers for cutaneous administration.**Química nova**.v.34. p-408-413,2011

NYVAD, B.; M. KILIAN. Microbiology of the early colonizers of human enamel and root surfaces in vivo.**Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 95, p. 369-380, 1987

NUNES, P.C.M.; CASATI, Z. M.; VILLALPANDO,T.K.; CIRANO,R.F. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. **Rev Inst Ciênc Saúde**. v 25. P 55-61, 2007

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development.**Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.54, p. 49-79, 2000.

OLIVEIRA DA, SALVADOR AA, SMÂNIA A, JR, SMÂNIA EF, MARASCHIN M, FERREIRA SR. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **J Biotechnol**v. 32 p.164-423, 2013

OPHIR, T.; GUTNICK, D. L. A role for exopolysaccharide in the protection of microorganisms from dissection.**Appl. Environ. Microbiol.**, Washington v. 60, p. 740-745, 1985.

OZYUR, H.; LUNA,C.;ESTÉVEZ,M. 2015. Redox chemistry of the molecular interactions between tea catechins and human serum proteins under simulated hyperglycemic conditions. **Food e Function**. DOI: 10.1039/C5fo01525a.

PAPADOPOULOU,A.; GREEN,R.J.; FRAZIER,R.A. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: **J. Agric.Food Chem.** A fluorescence quenching study. V53.pp 158-163,2005

POLLOCK JJ, DENEPITIYA L, MACKAY BJ, IACONO VJ. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infection and immunity*. 1984; 44:702–7

PROCTOR GB, PRAMANIK R, CARPENTER GH, REES GD. Salivary Proteins Interact with Dietary Constituents to Modulate Tooth Staining. **J Dent Res.** v.84, p.73-8, 2005.

RAYNAL B.D.E., HARDINGHAM T.E. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus. **J. Biol.Chem.** V. 278.pp.28703–28710, 2003 .

ROCCARO,S.;BLANCO,A.R.; GIULIANO,F.; RUSCIANO,D.; ENEA,V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrob Agents Chemother.** V48 (6), 1968.

ROSS,A.J.; KASUM, M.C. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annu Rev Nutr.**, v. 22, p19-34, 2002.

ROZEN R, BACHRACH G, BRONSHTEYN M, GEDALIA I, STEINBERG D: The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus* , *Streptococcus mutans* , *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus* . **FEMS Microbiol Lett;** v.195.p.205–210, 2001

ROZEN R, BACHRACH G, STEINBERG D: Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. **Carbohydr Res.** v.339.p2883–2888, 2004

RIIHINEN,K.R.; OU,Z.M.; GODECKER,T.; PAULI,G.F.; WU, C.D. The anti-biofilm of lingonberry flavonoids against oral pathogens is a case connected to residual complexity. **Fitoterapia.** V.97. p.78-86. 2014

RYKKE M, SONJU T. Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected *in vivo* after 2 hours and 24 hours. **Scand J Dent Res**, v.99, p.463–469, 1991.

RYKKE, M. SONJU, T. RØLLA, G. Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected *in vivo*. **Scand J Dent Res** v. 981.p29-134, 1990

SANTOS, J.L; SAUS, E.;SMALLEY, S. V.; CATALDO, L. R.; ALBERTI , G.; PARADA, J.; GRATACÒS, M.; ESTIVILL, X. Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research.**J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 5, p.117-31, 2012.

SAUTTER,K.C.; DENARDIN,S.; ALVES,.O.A.; MALLMANN,A.C.; PENNA,G.S.; HECKTHEUER, H.L. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc.Tecnol.Aliment,Campinas**. V25 p. 437-442, 2005

SHANMUGAM,T.S.P.; NAIR,R.P.; DE BENEDETTI.A.; CALDITO,G.;ABREO,F.; SUNAVALA-DOSSABHOY,G.Touseed kinase activator, gallic acid promotes homologous recombinational repair and suppresses radiation cytotoxicity in salivary gland cells. **Free radical Biology and medicine**. v93. pp 217-226,2016.

SHI,J.; YU, J.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seedsbiochemistry and functionality. **J Med Food**.v.6, p. 291-9, 2003

SHIHEIDO, Y.; MAEJIMA, Y.; SUZUKI,ICHI.JUN.; AOYAMA, N.; KANEKO, M.; WATANABE,R.; SAKAMAKI, Y.; WAKAYAMA, K.; IKEDA, Y.; AKAZAWA, H.; ICHINOSE, S.; KOMURO, I.; IZUMI,Y.; ISOBE, M. Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. **Journaul of Molecular and Cellualr cardiology**, 2016

SHIXIAN,Q.; VANCREY.B.;SHI,J.;KAKUDA,.Y.;JIANG,Y. Green tea extract thermogenesis-induced weight loss by epigallocatechin gallate inhibition of catechol-O-methyltransferase. **J med Food** v. 9, p-451-8, 2006

SIQUEIRA WL, CUSTÓDIO W, MSDONALD EE.New insights into the composition and function of the acquired enamel pellicle. **J Dent Res**. V 91.pp.1110-8, 2012

SIQUEIRA WL, LEE YH, XIAO Y, HELD K, WONG W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. **Proteomics**. v. 12, p.3426–35, 2012.

SIQUEIRA WL, ZHANG W, HELMERHORST EJ, GYGI SP, OPPENHEIM FG. Identification of protein components *in vivo* human acquired enamel pellicle using LC-ESIMS/MS. **J Proteome Res**. V.6. p. 2152-60. 2007.

SOARES RV, SIQUEIRA CC, BRUNO LS, OPPENHEIM FG, OFFNER GD, TROXLER RF. MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. **Journal of dental research**, v. 82, p. 471–5, 2003.

SOARES, S.; MATEUS, N.; FREITAS. Interaction of different polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α-amylase (HSA) by fluorescence quenching. **J. Agric. Food Chem**. V55.p.6726-675, 2007.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol** .v 28.p 12-55, 2000;2002.

STAUDER, M. et al. Inhibitory Activity by Barley Coffee Components Towards *Streptococcus mutans* Biofilm. **Cur Microbiol**. V.61.p. 417-421, 2010.

SUN, X.; SALIH, E.; OPPENHEIM, F.G.; HELMERHORST, E.J. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. **FASEB J**. v23.pp 2691-701, 2009. DOI 10.1096/Fj.09-13045

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by flavonoids. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**.; v.52, p.149-53, 2006.

TEIXEIRA EH, NAPIMOGA MH, CARNEIRO VA, DE OLIVEIRA TM, CUNHA RMS, HAVT A, MARTINS JL, PINTO VP, GONÇALVES RB, CAVADABS. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J Appl Microbiol**. 2006;101:111–16.

TEIXEIRA EH, NAPIMOGA MH, CARNEIRO VA, DE OLIVEIRA TM, NASCIMENTO KS, NAGANO CS, SOUZA JB, HAVT A, PINTO VP, GONÇALVES RB, FARIAS WRL, SAKER-SAMPAIO S, SAMPAIO AH. *in vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **J Appl Microbiol.**10:1001–6, 2007.

TRAEBERT, J.; MOREIRA,M.A.E.; BOSCO,L.V.; ALMEIDA,S.C.I. Transição alimentar: problema comum à obesidade e à cáriedentária. **rev.nutr**, campinas, v.17, n.2, abril/junho 2004

VACCA SMITH AM, BOWEN WH. *in situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Arch Oral Biol.**, 45:277-91, 2000.

VACCA SMITH AM, BOWEN WH. The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs *in situ*.**Caries Res.** v.34, p.88-93a, 2000.

Vacca-Smith AM, Bowen WH: Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol** v.43.p103–110, 1998

VACCA-SMITH AM, VAN WUYCKHUYSE BC, TABAK LA, BOWEN WH. The effect of milk and casein proteins on the adherence of *Streptococcus mutans* to saliva-coated hydroxyapatite.**Arch Oral Biol.**; v.39, p. 1063-9, 1985.

VENKITARAMAN AR, VACCA-SMITH AM, Kopec LK, Bowen WH: Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. **J Dent Res** v.74.p1695–1701, 1995

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* hydroxiapatiteadsorbedsalivaryproteins.**BiochemBiophys Res Commun.**v. 320. p. 342-346. 2004. Pegar na pubmed

VUKOSAVLJEVIC. D.; CUSTODIO,W.; SIQUEIRA, L.W. Salivaryproteins as predictorsandcontrols for oral health. **J. Cell Commun.** Signa, v5, p 271–275, 2011.

Vukosavljevic., D.; & Custodio, W.; & Siqueira, L.W. Salivary proteins as predictors and controls for oral health. *J. Cell Commun. Signa*, v5, p 271–275, 2011.

WERNERSSON J, DANIELSSON NIEMI J, EINARSON S, HERNELL O, JOHANSSON I. Effects of Human Milk on Adhesion of *Streptococcus mutans* to Saliva-Coated Hydroxyapatite *in vitro*. **Caries Res.**; v.40, p.412–7, 2006.

with human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v 149, pp. 58-67, 2015.

XI CHU, Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Pharmacological Sciences**. Doi.org.org/10.1016/j.phs.2015.12.002

XIONG, Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/ROCK signaling pathway. **Oncol Lett**. V.1 p. 484–490, 2016

XU, X; ZHOU, D; XUE.; WU, D, C. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. **Arch Oral Bio**. V.57, p 678-683, 2012.

XU, XIN., ZHOU, D, XUE.; WU, D, C. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. *Arch Oral Bio*. V57, p 678-683. 2012

Yan Q, Bennick A. Identification of histatins as tannin-binding proteins **Biochem J** v.311 p.341-347, 1995

YAO. The interactions of epigallocatechin-3-gallate with human whole saliva and parotid saliva. **Archives of oral biology**. V 55, p-470-478, 2010

Yao, Y.. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. **Arch Oral Biol** v.46 p.293-303, 2001

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.* *Eur J Oral Sci.* V 120.p 140-146,2012

Zarychta, b.; Christopher. G.; Gianopoulos, A.; Pinkerton, A. Revised structure of trans-resveratrol: Implications for its proposed antioxidant mechanism. **Bioorg Med Chem Lett**, V26 p.1416-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.01.070, 2016

ZHANG, J.; KASHKET, S. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. **Caries Res.**, v.32 , p.233-8, 1998

ZHANG, Y. Studies on the interaction of gallic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments. **Elsevier**. v76. pp246-253, 2008

ZHOU, X. *et al*, Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of salivary adenoid cystic carcinoma cells by reversing the hypermethylation status of the RECK gene. **Mol Med Rep.** V 12.P.6031-6. 6031-6. doi: 10.3892/mmr.2015.4213, 2015.

ANEXO

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Interações de polifenóis e proteínas salivares e sua interferência na formação da película dental adquirida

Pesquisador: Janayna Schmitz Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37417614.2.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímicas

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 888.649

Data da Relatoria: 18/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa proveniente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímicas da UFPR da mestranda Janayna Schmitz Silva sob orientação da Prof. Elaine Machado Benelli. Será desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Macromoléculas no período de novembro de 2014 a março de 2016.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Verificar as interações de polifenóis com as proteínas da saliva na formação da película dental adquirida do esmalte.

Específicos:

- Purificar algumas proteínas salivares
- Estudar a interação das proteínas salivares purificadas com diferentes polifenóis em solução
- Estudar o efeito dos polifenóis na composição da película adquirida in vitro em pó de hidroxiapatita e esmalte dental bovino.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo as pesquisadoras, os riscos da metodologia são associados ao constrangimento dos indivíduos durante a coleta de saliva. Assim, estas serão realizadas de forma individualizada e o

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 888.649

pesquisador utilizará luvas descartáveis e material autoclavado para evitar contaminação. Os benefícios com este estudo é auxiliar no desenvolvimento de dentifrícios que contenham estes aditivos. Quanto aos participantes, será determinado o fluxo salivar estimulado que indica a sua propensão a desenvolver cáries.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A partir da saliva coletada dos participantes do estudo algumas proteínas salivares serão purificadas e suas interações em solução com os polifenóis serão estudadas. Posteriormente, serão realizados experimentos de formação de película adquirida sobre pó de hidroxiapatita e esmalte dental bovino para analisar a interferência dos polifenóis na composição da película formada in vitro. A coleta de saliva estimulada será feita pelo método de splitting em que os participantes receberão um pedaço de parafina para mastigar. A saliva formada no primeiro minuto será descartada e, em seguida, os participantes coletarão de 10 a 20 mL de saliva. As pesquisadoras destacam que o material coletado será utilizado especificamente para os propósitos desta pesquisa. As amostras dos polifenóis serão adquiridas comercialmente da SIGMA ou Chromadex. As técnicas experimentais para a purificação das proteínas salivares, sua interação com os polifenóis, bem como a análise da interferência desta interação na formação da película dental adquirida do esmalte formada sobre pó de hidroxiapatita e sobre dentes bovinos estão descritas no projeto. Os dentes bovinos serão coletados em abatedouros de Curitiba após a concordância dos mesmos.

O recrutamento dos participantes deste estudo, estimado de 10 a 15 voluntários, será realizado via email endereçado aos alunos de graduação e pós-graduação que realizam atividades de pesquisa no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Neste email estarão esclarecidos os objetivos do estudo, a participação dos voluntários com a coleta de saliva e a necessidade de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados, inclusive a aprovação do projeto no Programa de Pós-graduação correspondente.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, 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:

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 888.649

NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas e sou favorável à aprovação do protocolo. No entanto, solicito que a pesquisadora insira NO TCLE o destino das amostras de saliva após o término da pesquisa (esta inferência foi feita somente no corpo do projeto).

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 27 de Novembro de 2014

Assinado por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br