

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Faculdade de Odontologia**

**ANÁLISE DO METABOLOMA SALIVAR DE CRIANÇAS POR MEIO  
DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo  
CD

Rio de Janeiro

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Faculdade de Odontologia**

**ANÁLISE DO METABOLOMA SALIVAR DE CRIANÇAS POR MEIO  
DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo  
CD

Dissertação submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Orientadores:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
Prof<sup>a</sup> Titular da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Canedo Valente  
Prof<sup>a</sup> Adjunta da Disciplina de Bioquímica do Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ

Rio de Janeiro

2010

# ANÁLISE DO METABOLOMA SALIVAR DE CRIANÇAS POR MEIO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

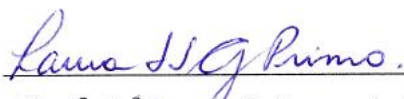
Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

CD

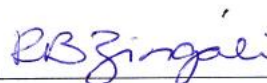
Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Canedo Valente

Dissertação submetida ao corpo docente da  
Faculdade de Odontologia da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Odontologia (Odontopediatria).

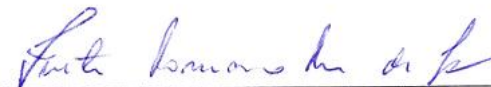
Comissão Examinadora:



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Salignac de Souza  
Guimarães Primo



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Russolina  
Benedeta Zingalli



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico  
Ribeiro de Souza

Rio de Janeiro

2010

## Ficha Catalográfica

Fidalgo, Tatiana Kelly da Silva

Análise do metaboloma salivar por meio da ressonância magnética nuclear / Tatiana Kelly da Silva Fidalgo. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2010.

xii, 113 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza e Ana Paula Canedo Valente

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Odontologia / Odontopediatria , 2010.

Referências bibliográficas: f. 76-82

1. Saliva. 2. Criança. 3. Metaboloma. 4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. 5. Cárie. 6. Medicamentos. 7. Biodiagnóstico. - Tese. I. Souza, Ivete Pomarico Ribeiro. II. Valente, Ana Paula Canedo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Odontopediatria e Ortodontia. IV. Análise do metaboloma salivar por meio da ressonância magnética nuclear.

## DEDICATÓRIA

*À Deus  
que sempre cumpre o que promete, por ter aberto portas as quais  
nunca ousei sonhar. Por nunca desistir de mim e me  
proporcionar bênçãos sem fim.*

*À minha bisavó Adália Richardelli (in memoriam),  
sempre muito amorosa nunca mediu esforços para que eu um dia  
pudesse chegar até aqui, a você ofereço meu eterno amor.*

## AGRADECIMENTOS

- À minha avó-mãe **Neuza Macedo** que sempre abdicou de sua vida para me dar o suporte, para me educar. Obrigada pelas incessantes orações, por me ensinar o caminho a seguir ainda criança. Obrigada por me dar o apoio para que eu avançasse, por lutar a minha luta durante todos esses anos.

*"Vós, filhos, sede obedientes a vossos pais no Senhor."  
(Efésios 6:1)*

- À minha mãe **Claudia Macedo**, que mesmo distante sempre se preocupou e me amparou nos momentos difíceis, orando, participando, torcendo por mim e compreendendo minhas ausências.

*"Honra a teu pai e a tua mãe, para que se prolonguem os teus dias na terra  
que o Senhor teu Deus te dá."  
(Êxodo 20:12)*

- À minha tia **Alece Ricahardelli** que me incentivou desde o princípio, que acreditou no meu potencial, que investiu em mim e sempre foi um exemplo de perseverança e determinação e ao meu tio **Márcio Cunha** que como um pai sempre me incentivou.
- Às minhas irmãs **Bianca e Bruna**, que apesar da distância, sempre foram companheiras e me perdoem por não estar tão presente.
- A minha prima-irmã **Alessandra Richardelli** sempre torceu e orou por mim. Creio que servi como um modelo e hoje me orgulho muito de você!
- Aos meus amigos **Aline Jardim, Carla Caetano, Eurico Souza, Jefferson Moraes, Lívia Caetano e Juilberto Martins** que sempre cuidaram e oraram por mim.

*"Há amigos mais chegados que um irmão."  
(Provérbios 18:24)*

- À minha amiga **Lívia Mourão**, minha duplinha de faculdade que mesmo longe nunca se esquece de mim, aprendi muito com você minha amiga “germ-free”.
- Aos amigos de faculdade **Annie Mariny, Camila Gornic, Carolina Lopes, Natália Prado, Raquel Lopes, Renata Otero, Tatiane Campos e Vicente Teles**. Obrigada pelo apoio desde a graduação, foi uma honra tê-los na mesma turma.

*“A amizade é como as estrelas. Não às vemos toda hora, mas sabemos que existem.”*  
(Marina Camargo)

- À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Dias**, por todo o incentivo. Desde a graduação me deu todo o apoio quando disse que gostaria de seguir a carreira acadêmica. É incrível sua capacidade de apoiar todos os que se mostram interessados. Essa é a oportunidade para eu dizer que você é um exemplo de humildade, gentileza e de amor!

*“É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho, de observar com atenção a vida real, de confrontar a observação com nosso sonho, de realizar escrupulosamente nossas fantasias. Sonhos, acredite neles.”*  
(Vladimir Lenin)

- Aos amigos do mestrado **Adílís Alexandria, Ana Carolina Valinoti, Camila Nassur, Daniel Brito, Erika Kuchler, Marina Jesus, Patricia Tannure, Rafael Pedro, Raquel Pinheiro, Renata Otero, Senda Charone e Ticiane Medeiros** com quem convivi dia após dia e dividi alegrias e angústias. Vocês foram essenciais!

*“A amizade pode existir entre as pessoas mais desiguais. Ela as torna iguais.”*  
(Aristóteles)

- À amiga **Viviane Pierro** pelas palavras de amizade e apoio, te admiro muito. Adoro nossas conversas científicas!
- À amiga, que considero uma irmã, **Roberta Barcelos** com quem aprendi muito desde a iniciação científica, obrigada pelo incentivo, como é bom te ver em lugares altos. Tenho muito orgulho de você!

*“Desde a antiguidade ainda não se viu, nem se ouviu um Deus que trabalha para aqueles que nele esperam.”*  
(Isaías 64:4)



- Aos amigos do doutorado **Ana Karla, Andrea Antônio, Carla Martins, Cristiana Aroeira, Lívia Azeredo, Luciana Pomarico, Marcia Santos, Marcia Thomas, Roberta Barcelos e Valéria Abreu, Viviane Pierro**, mesmo em meio à correria sinto carinho por cada uma de vocês.
- À amiga **Lizandra Ferrari**, que me fez conhecer e me encantar pela Odontopediatria quando ainda era sua aluna de iniciação científica.
- Aos funcionários e amigos da disciplina de Odontopediatria: **Bruna, Isabel, João Carlos, Luiza, Maria José (Zezé), Robson, Rose, Sr. Jorge, Andrea, Gina, Katia e Mary** por sempre estarem por perto me auxiliando, sempre com bom humor e boa vontade, mais que funcionários, tornaram-se amigos.
- Ao **Prof Dr Fernando Costa e Silva Filho** com quem iniciei e aprendi muito, obrigada por me receber em seu laboratório quando era ainda graduanda e aos companheiros de laboratório **Bruno, Gustavo, Débora e Lilian**.
- Aos amigos que fiz no laboratório do CNRMN: **Carolina, Carolina (little) Catarina, Chico, Débora, Fabrício, Guilherme, Laura, Luciana, Thalita e Viviane** que sempre estavam de bom humor, muitas vezes após um dia cansativo conseguiam me arrancar boas risadas, obrigada por tornar o fardo mais leve! Aprendo muito com vocês!

*“A gargalhada é um tranquilizante sem efeitos colaterais.”  
(Arnold H. Glasow)*

- À amiga **Renata Angeli**, ela definitivamente é uma estrela! Obrigada por me ensinar os segredos do 400Mhz e por estar sempre disposta, quer seja feriado, final de semana ou férias. Sem você seria muito difícil chegar até aqui.

*“Nós nascemos para a cooperação, como são os pés, as mãos, as pálpebras e o abrir e fechar das mandíbulas.”  
(Marcus Aurelius)*

- Ao amigo **Elicardo** que começou o projeto e me ensinou muito. Sempre com muita paciência e disposto a ajudar nos dava o suporte estatístico.
- À psicóloga **Neyde** e às fonoaudiólogas **Cíntia e Fernanda** pela descontração e ajuda, eram constantes as palavras de ânimo, estas ajudavam a amenizar os dias durante o curso.

- À **Profª Drª Glória Castro**, sempre tão compreensiva com os alunos e muito tranqüila. Ela, de uma forma única, consegue conciliar serenidade e competência! Obrigada pelos conhecimentos transmitidos.

*“Não é o cérebro que importa mais, mas sim o que o orienta: o caráter, o coração, a generosidade, as idéias.”*  
(Fiodor Dostoiévski)

- À **Profª Drª Laura Primo** com quem iniciei na Odontopediatria. Quero dizer que sou muito grata por tudo. Obrigada por acreditar tanto em mim, por ter sempre palavras carinhosas, me compreendendo apenas num olhar, isso não tem preço. É sempre um prazer trabalhar com você.

*“A diferença entre o vencedor e o perdedor não é a força nem o conhecimento, mas, sim, a vontade de vencer.”*  
(Vincent T. Lombard)

- Às **Profas Nena e Fátima** por tornarem o ambiente de clínica tão agradável.
- Ao **Prof Dr Rogerio Gleiser, Marcelo Castro e João Farinhas** obrigada pela atenção, por sempre serem receptivos e dispostos a ajudar.

*“Que sua colheita seja abundante e eterna e o sorriso da felicidade e do sucesso enfeite os seus lábios.”*  
(Lauro Trevisan)

- À **Profª Drª Lucianne Cople**, de quem tenho muito orgulho, um exemplo de perseverança e vontade! Ela idealizou um sonho de graduação: o nosso laboratório! Obrigada por me fazer acreditar que sempre vale a pena, que sempre podemos melhorar, obrigada por me ouvir, por me aconselhar e quando necessário fosse, por calar. Você tem uma capacidade incrível de me gerar uma inquietude que me faz avançar, obrigada por isso!

*“Viver intensamente, é você chorar, rir, sofrer, participar das coisas, achar a verdade nas coisas que faz. Encontrar em cada gesto da vida o sentido exato para que acredite nele e o sinta intensamente.”*  
(Leila Diniz)

- Aos **pequenos pacientes**, sou grata por permitirem entrar em seus pequenos mundos.

*“Pequena criança, pura e confiante, volto a ser quando meus olhos encontram os olhos de pequenos infantes.”*  
(Autor desconhecido)

- À **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liana Fernandes**, sem a qual esse projeto não seria viável. Sempre tão atenciosa e entusiasmada com minhas idéias! Obrigada por acreditar que eu seria capaz e por me confiar esse presente o qual eu sei que é tão importante! Até seus filhos se “voluntariaram” para amostra... Você é muito especial!

*“A coragem é a primeira qualidade humana, pois garante todas as outras.”*  
(Aristóteles)

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Valente** e ao **Prof Dr Fábio Lacerda**, que admiração eu sinto! Vocês são exemplos de abnegação e de amor pelo que fazem. Não contentes apenas com Gabi como filha, adotaram o 400, 600 e 800MHz para a família! Obrigada por me abrir as portas do laboratório e por me confiarem esse projeto do qual tanto me orgulho!

*“Você vê coisas e diz: Por que?; mas eu sonho coisas que nunca existiram e digo: por que não?”*  
(George Bernard Shaw)

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico**, por quem tenho muita admiração, carinho e com quem tanto cresci durante esses dois anos. O que posso dizer é que muito aprendi com a senhora, uma pessoa brilhante que sempre tem uma palavra incentivadora. Muitas vezes o aprendizado não era por meio de palavras pronunciadas, mas por atitudes, o que para mim torna-se ainda mais encantador! Tenho muito orgulho de ter sido sua orientanda. Obrigada por acreditar no meu potencial e pela oportunidade ímpar!

*“O grande homem é silenciosamente bom... É genial, mas não exhibe gênio... É poderoso, mas não ostenta poder... Socorre a todos, sem precipitação... É puro, mas não vocífera contra os ímpuros...”*  
(Huberto Rohden)

*“É melhor tentar e falhar que ocupar-se em ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que nada fazer. Eu prefiro caminhar na chuva, em dias tristes, a me esconder em casa. Prefiro ser feliz, embora louco, a viver em conformidade.”*  
(Martin Luther King Jr.)

*“Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do Homem, são as que Deus preparou para os que o amam.”*  
(1 Coríntios 2:9)

## RESUMO

FIDALGO, Tatiana Kelly da Silva. **Análise do metaboloma salivar de crianças por meio da Ressonância Magnética Nuclear** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil metabólico de saliva de crianças por meio da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Amostras de saliva total não estimulada de 51 crianças saudáveis foram coletadas e separadas de acordo com as dentições, a saber, decídua (n=16), mista (n=18) e permanente (n=18). Para avaliação de cárie, após avaliação do índice ceod/CPOD, amostras de saliva total não estimulada de crianças na dentição mista sem lesões cáries (n=18) e com lesões cáries (n=18) foram coletadas. Para análise da influência de um anti-histamínico sob a forma de xarope em metabólitos salivares *in vitro* e *in vivo*, 5 voluntários saudáveis foram recrutados; realizou-se interação do medicamento com a saliva *in vitro* e *in vivo* (bochecho com medicamento). Todos os espectros <sup>1</sup>H RMN foram adquiridos e processados em um espectrômetro de 400 MHz (Bruker). Procedeu-se a análise dos componentes principais (ACP) e da distância padrão (DP) para a distinção das dentições decídua, mista e permanente. Para a distinção do grupo isento de lesões de cárie e com a presença de lesões, utilizou-se ACP e IN correlacionando o ceod/CPOD e o teste F para avaliação dos metabólitos entre os grupos. Diversos grupos de metabólitos apresentaram diferença estatística entre as condições avaliadas (p<0.05). Não houve diferença estatística entre a interação de metabólitos salivares com o medicamento *in vitro* e *in vivo*. A metodologia empregada demonstrou ser uma importante ferramenta para estudos susceptibilidade, diagnóstico e processo da doença cárie e outras doenças orais e sistêmicas.

**DESCRITORES:** Saliva, Metaboloma, Cárie dental, Química Farmacêutica, Criança, Espectroscopia de Ressonância Magnética.

## SUMMARY

FIDALGO, Tatiana Kelly da Silva. **Analysis of children metabolome using Nuclear Magnetic Resonance**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

The aim of this study was to evaluate children salivary metabolomic profile using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Unstimulated whole saliva samples from 51 health children separated according dentition stage, primary (n=16), mixed (n=18) and permanent (n=18). For caries asses, after dmft/DMFT index avaliation, unstimulated whole saliva samples from children in mixed dentition without (n=18) and with presence of caries lesion (n=15) were collected. For analysis of anti-histaminic syrup containing influence in salivary metabolites, 5 healthy volunteers were recruited; *in vitro* and *in vivo* (rinse with medicine) interaction with antihistaminic-containing syrup was performed. All  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired and processed on a 400 MHz spectrometer (Bruker). Principal analysis component (PCA) and standard distance (SD) were applied for distinguish dentitions. For statistical analysis was used PCA, normalcy index for distinguishing presence or absence of caries lesion and correlated with DMFT index and F test for assess metabolites differences between groups. Several groups' metabolites presented statistical difference between conditions assessed ( $p < 0.05$ ). Was not found statistical difference between *in vitro* and *in vivo* salivary metabolites and medicine interaction. The methodology employed demonstrated to be an important tool to support susceptibility, diagnostic and disease progress studies in dental caries, oral and other systemic disorders.

**KEY-WORDS:** Saliva, Metabolome, Tooth caries, Chemistry, Pharmaceutical, Children, Magnetic Resonance Spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1

- Figure 1:** Representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum of child saliva samples in the 0–4.5ppm (A,B,C) and 5.5–10.0ppm regions (D,E,F). A, D- Primary dentition; B, E- Mixed dentition; C, F- Permanent dentition. No statistical differences were found among dentitions in the 5.5–10.0ppm region. Assignments: 1- propionate, 2- ethanol, 3- propane-1,2-diol, 4- gamma aminobutyric acid, 5- proline, 6- valine..... 30
- Figure 2:** A- Principal components analysis shows no differences among dentitions; B- Standard distance showing low inter-individual variability in permanent dentition..... 31

### Artigo 2

- Figure 1:** Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of whole saliva from caries-lesion free (A) and caries-lesion (B) child subjects demonstrating differences in metabolites (1- propionate, 2-lactate, 3- acetate, 4- ornithine, 5- 4-hydroxyproline, 6- sucrose, 7-  $\alpha$ -glucose and 8- 3-D-hydroxybutyrate)..... 48
- Figure 2:** A- Scores plot of a two-component PCA model of  $^1\text{H}$  NMR spectra showing sample clustering according to presence or absence of caries-lesion. The percentage of variance captured by PC3 was 7.84% and PC4 was 10.93%. B- Standard distance showing that caries lesion-free subjects presented lower SD values than caries-lesion ones..... 49

**Artigo 3:**

**Figure 1:** Representative <sup>1</sup>H NMR spectra of salivary metabolites components before and after syrup mouthwash subjects, demonstrating differences in regions of spectra. A,E – Spectra before syrup mouthwash; B,F – Spectra after *in vitro* antihistaminic interaction; C,G - Spectra after *in vivo* antihistaminic interaction; D,H – Spectra of antihistaminic. In the 0-4.5ppm (A,B,C, and D) could be identified metabolites that differed before and after antihistaminic interaction (1-propionate, 2-acetate, 3- γ-aminobutyrate, 4-glumatate, 5- isoleucine, 6-sucrose, 7- α-galactose and 8- α-glucose); and 5.5-10.0ppm (E,F,G and H) were indicated metabolites that differed before and after antihistaminic interaction (9-histidine and 10-phenylalanine)..... 65

**Figure 2:** Scores plot of a two-component PCA model of <sup>1</sup>H NMR spectra showing sample clustering before (●) and *in vitro* (●) and *in vivo* (●) antihistaminic interaction. The percentage of variance captures by PC1 was 80.46% and PC2 was 8.64%..... 66



## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

<b>Table 1:</b> Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ( $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey's test) detectable in 400 MHz. $^1\text{H-NMR}$ spectra comparison between primary, mixed and permanent dentition.....	32
---	----

<b>Table 2:</b> Normalcy index for classify primary, mixed and permanent dentition.....	33
---	----

### Artigo 2

<b>Table 1:</b> The normalcy index and the distances classifying caries lesion free lesion and caries-lesion individuals with respectives dmft/DMFT and number of teeth with caries lesion.....	50
---	----

<b>Table 2:</b> Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ( $p < 0.05$ ) detectable in 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra comparison between caries-lesion and caries-lesion free children subjects.....	51
---	----

### Artigo 3

<b>Table 1:</b> Resonance Resonance assignments of salivary metabolites components ( $p < 0.05$ ) before and after syrup mouthwash subjects.....	67
--	----

## LISTA DE SIGLAS

<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ceod</b>	Cariado, perdido, obturado – dente decíduo
<b>CPOD</b>	Cariado, perdido, obturado – dente permanente
<b>CPMG</b>	Carr–Purcell–Meiboom–Gill
<b>DMFT</b>	Decayed Missing Filled – tooth
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Deuterium oxide
<b>DSS</b>	Sodium 2,2-Dimethyl-2-Silpentane-5-Sulfonate
<b>FO/UFRJ</b>	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>FID</b>	Free Induction Decay
<b>IESC</b>	Instituto de Estudos em Saúde Coletiva
<b>IPPMG</b>	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
<b>μl</b>	Microlitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>1D <sup>1</sup>H-NMR</b>	One dimensional spectrum of Nuclear Magnetic Resonance
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>PCA</b>	Principal analysis components
<b>DS</b>	Standard distance
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TOCSY</b>	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H total correlation
<b>TSP</b>	Sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] propionate

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\delta$	Chemical Shift (Deslocamento químico)
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\lambda$	Lambda (Comprimento de onda)
=	Igual
$\pm$	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 PROPOSIÇÃO.....	07
3 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	08
4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	15
4.1 ARTIGO 1.....	16
4.1 ARTIGO 2.....	34
4.1 ARTIGO 3.....	53
5 DISCUSSÃO. ....	68
6 CONCLUSÃO.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
8 ANEXOS .....	82
9 APÊNDICE.....	91

# 1 INTRODUÇÃO

A saliva é um biofluido que desempenha importante papel na homeostase da cavidade bucal. Fatores locais como anatomia dental e a topografia da superfície dental podem igualmente influenciar direta ou indiretamente no equilíbrio da cavidade bucal (Van Steijn, Amerongen *et al.*, 2002). O rompimento da homeostase poderá acarretar no desenvolvimento do biofilme dental. Por sua vez, as interações do biofilme com o hospedeiro também serão influenciadas pela dinâmica dos eventos moleculares envolvidos com o meio ambiente exposto à saliva, que poderá propiciar o desenvolvimento de doenças orais (Schupbach, Oppenheim *et al.*, 2001; Yao, Berg *et al.*, 2003).

Alterações salivares podem ser a resposta para microalterações dos tecidos dentais, devido às modificações bioquímicas no fluido salivar favorecendo o aumento do risco a cárie dental (Dale, Tao *et al.*, 2006). No que concerne ao diagnóstico dessas alterações moleculares, biomarcadores locais e sistêmicos são objetos de estudos recentes. Na era do proteoma, conjunto de proteínas de determinado biofluido, correlaciona-se a presença, ausência ou modificações de proteínas às doenças sistêmicas e da cavidade bucal (Ayad, Van Wuyckhuysse *et al.*, 2000; Van Nieuw Amerongen, Bolscher *et al.*, 2004; Wong, 2006).

Desta forma, ressalta-se o relevante papel da identificação de biomarcadores para doenças sistêmicas e bucais, a exemplo da investigação

de cânceres bucais, destacando-se o aumento da interleucina-6; e das doenças auto-imunes, como a síndrome de Sjögren, sendo viável seu diagnóstico através da detecção da alteração do perfil protéico (Nair e Schroeder, 1986; Delaleu, Immervoll *et al.*, 2008). Doenças sistêmicas como esclerose e câncer de mama também podem ser identificadas através da alteração do perfil protéico (Giusti, Bazzichi *et al.*, 2007; Katakura, Kamiyama *et al.*, 2007; Shpitzer, Bahar *et al.*, 2007; Emekli-Alturfan, Demir *et al.*, 2008; Tan, Sabet *et al.*, 2008).

Além do estudo de biomarcadores para doenças, a avaliação da composição protéica auxilia na melhor compreensão entre a relação microrganismo-hospedeiro na cavidade oral, como a capacidade de bactérias do biofilme dental de utilizar a mucina 5B como fonte de nutrição (Wickstrom e Svensater, 2008). A literatura relata ainda que a variabilidade nas proteínas salivares e suas alterações podem exercer um importante papel na determinação de sua função protetora contra a cárie dental (Banderas-Tarabay, Zacarias-D'oleire *et al.*, 2002). Tem-se demonstrado ainda que a formação de complexos entre moléculas como MG-1, amilase salivar, PRPs, e a estaterina são determinantes na formação do biofilme e da cárie dental (Nieuw Amerongen, Oderkerk *et al.*, 1987). Para atividade de cárie subclínica é possível detectar a ausência da proteína solúvel CD14, possível biomarcador por estar envolvida na resposta imune inata (Bergandi, Defabianis *et al.*, 2007).

Apesar da saliva ser um biofluido complexo composto por metabólitos inorgânico e orgânico de alto e baixo peso molecular, poucos são os estudos direcionados a avaliação do perfil de metabólitos de baixo peso molecular (Silwood, Lynch *et al.*, 2002; Grootveld e Silwood, 2005). O conhecimento dos

produtos finais que compõem o fluido salivar, denominado metaboloma da saliva, é de extrema importância não apenas na odontologia, mas também na área médica, para a detecção de doenças sistêmicas utilizando a saliva como meio diagnóstico (Grootveld e Silwood, 2005; Rochfort, 2005; Bertram, Eggers *et al.*, 2009). O metaboloma tem por objetivo a compreensão dos produtos metabólicos como nucleotídeos, aminoácidos, açúcares, lipídeos e outras moléculas de amostras biológicas. Dentre sua vasta aplicabilidade destacam-se a toxicidade de drogas, biomarcadores, genoma funcional e patologia molecular (Rochfort, 2005; Xu, Lu *et al.*, 2007). A partir do metaboloma é possível a detecção de alterações bioquímicas resultantes de processos sistêmicos, tal como o diagnóstico de diferentes doenças, a exemplo da síndrome de Sjögren (Delaleu, Immervoll *et al.*, 2008), diversos tipos de câncer bucais (Nagler, Bahar *et al.*, 2006; Shpitzer, Bahar *et al.*, 2007; Tan, Sabet *et al.*, 2008), diabetes mellitus (Yoon, Jankowski *et al.*, 2004) e até mesmo a AIDS (Atkinson, Yeh *et al.*, 1990; Coogan e Challacombe, 2000; Lin, Johnson *et al.*, 2003).

A saliva apresenta uma série de fatores locais e atividades bioquímicas que exercem impacto no biofilme dental e, portanto devem ser consideradas nos estudos de cariologia (Hay, 1995). Não obstante, os medicamentos são considerados fatores locais que também podem atuar na alteração da homeostase da cavidade oral, causando modificações dos componentes bioquímicos da saliva, culminando em alterações no tecido dental. A utilização prolongada desses medicamentos, a exemplo de doenças crônicas, aumenta o risco à cárie dental (Maguire e Rugg-Gunn, 1994).

Medicamentos líquidos, pela sua forma de apresentação, entram em contato direto com o meio bucal (dentes, tecidos moles, saliva, biofilme e outros) e podem apresentar composição química com potencial de promover alterações no mesmo. Os medicamentos líquidos utilizados por crianças são normalmente adocicados, sendo a sacarose o carboidrato mais utilizado para este fim (Tenuta, Del Bel Cury *et al.*, 2006). Tal fato caracteriza estas formulações como potencialmente cariogênicas, visto que a sacarose atua como substrato para fermentação da microbiota bucal e, por conseguinte, tem a capacidade de promover grande atividade acidogênica com a consequente queda do pH da placa dental. A associação entre a utilização desses fármacos contendo sacarose com aumento da experiência de cárie dental é bem descrita na literatura (Shaw e Glenwright, 1989; Pierro, Abdelnur *et al.*, 2005; Maguire, Baqir *et al.*, 2007).

A literatura relata que xaropes infantis com baixo pH se mostraram capazes de provocar erosão do esmalte bovino, embora alguns deles não tenham influenciado significativamente na rugosidade do esmalte (Pierro, Abdelnur *et al.*, 2005). Apesar de serem amplamente exploradas as alterações das estruturas dentais após o contato com os medicamentos, pouco é estudado sobre as modificações causadas diretamente na saliva após o contato com componentes químicos (Cury, Rebelo *et al.*, 2000; Tenuta, Del Bel Cury *et al.*, 2006), como medicamentos.

A alergia alimentar e rinites estão entre as patologias mais comuns na infância (Levy, Price *et al.*, 2004). O composto loratadine (Claritin<sup>®</sup>) é amplamente utilizado em crianças com quadros alérgicos e sabe-se que pacientes com alergia apresentam redução do fluxo salivar (Elad, Heisler *et al.*,



2006), além de alguns antistamínicos estarem associados à alta experiência de cárie (Thomson, Spencer *et al.*, 2002).

Diversas metodologias são capazes de identificar componentes salivares, como a espectroscopia de massas, comumente utilizadas para detecção de proteínas (Troxler, Offner *et al.*, 1990; Hardt, Thomas *et al.*, 2005) e os métodos que identificam componentes distintos, como os diferentes tipos de cromatografia: gás-líquida (GLC) (Lambert e Moss, 1972) de coluna (Vratsanos e Mandel, 1982) e de alta performance (HPLC) (Linke e Moss, 1992). Porém, esses métodos exigem amplo conhecimento sobre as biomoléculas a serem analisadas, como um pré-requisito para a análise propriamente dita. Dentre os métodos capazes de identificar detalhadamente componentes de menor peso molecular, destaca-se a ressonância magnética nuclear (RMN) (Silwood, Lynch *et al.*, 2002).

A RMN vem sendo utilizada na avaliação dos metabólitos da urina (Brindle, Antti *et al.*, 2002; Walsh, Brennan *et al.*, 2006), do sangue (Brindle, Antti *et al.*, 2002) e recentemente, da saliva (Silwood, Lynch *et al.*, 2002). Mais de 60 biomoléculas endógenas e exógenas da saliva podem ser analisadas, dentre elas as provenientes do metabolismo glandular, do fluido gengival, da dieta, de produtos relativos à saúde oral, além de produtos farmacêuticos (Silwood, Lynch *et al.*, 2002). Entretanto, devido à dificuldade da análise estatística dos dados, este método foi subutilizado, e recentemente, com o avanço da estatística vem sendo novamente empregado, especialmente com a aplicação de métodos que utilizam análise dos componentes principais (Takeda, Stretch *et al.*, 2009).

Desta forma, torna-se relevante a identificação do perfil salivar de indivíduos saudáveis e das possíveis alterações no padrão metabólico salivar, para a melhor compreensão dos processos bioquímicos que ocorrem nesse biofluido. O estabelecimento de um padrão-ouro poderá auxiliar futuramente no biodiagnóstico por meio da saliva, visando detectar alterações que possam causar patologias nos tecidos bucais.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar o perfil metabólico de crianças saudáveis sem e com lesões cárias e determinar o perfil metabólico salivar de adultos após interação *in vivo* e *in vitro* com um anti-histamínico sob a forma de xarope.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil metabólico salivar de baixo peso molecular de crianças saudáveis sem cárie, em diferentes fases de dentição, a saber, decídua, mista e permanente;
- Avaliar os metabólitos salivares de baixo peso molecular de crianças saudáveis na dentição mista com e sem lesões cárias;
- Avaliar metabólitos salivares de baixo peso molecular de adultos saudáveis após interação *in vitro* e *in vivo* com um anti-histamínico infantil sob a forma de xarope.

### **3 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

O primeiro artigo deste estudo objetivou avaliar o perfil metabólico salivar de crianças saudáveis por meio de RMN. Este estudo se caracterizou por uma pesquisa transversal do tipo experimental. A seleção da amostra adotou procedimentos intencionais de conveniência. Os critérios de inclusão foram crianças de 3 a 13 anos de idade sem alterações sistêmicas e bucais, como cáries e doença periodontal. Os participantes também não deveriam fazer uso de agentes antimicrobianos durante 6 meses prévios à coleta salivar e sem alimentar-se 2 horas antes da coleta. As crianças do estudo eram da creche-escola do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG). Previamente à realização do estudo, obteve-se aprovação do Comitê de Ética do IPPMG (protocolo 23/07; Anexo 1, página 83) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2, página 84).

O segundo artigo deste estudo objetivou avaliar o perfil salivar metabólico de crianças com e sem cárie por meio da RMN. Para tanto se coletou saliva total de crianças de 3 a 12 anos de idade, utilizando os mesmos critérios de inclusão do estudo 1. A amostra de crianças sem cárie eram as mesmas provenientes do estudo 1. Já a amostra com cárie era proveniente de crianças atendidas na clínica de Odontopediatria do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO-URFJ. Foi realizada avaliação dos

metabólitos salivares em diferentes condições, tais como em estado de jejum e após a ingestão de alimentos e das glândulas (parótida, sublingual e submandibular) para avaliação de componentes endógenos e exógenos (Apêndice 1, página 92). Este estudo foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC; protocolo 66/09; Anexo 3, página 85) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4, página 86).

O terceiro artigo consistiu em uma avaliação dos metabólitos salivares *in vitro* e *in vivo* de um anti-histamínico de uso pediátrico sob forma de xarope, o Claritin® (1mg/ml - Lote 701; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) por meio da RMN. Previamente às análises por RMN, realizou-se interação da saliva *in vitro* com o medicamento, utilizando espectrofotometria (Apêndice 2, página 94). Após a averiguação da alteração metabólica por meio de espectrofotometria ( $p=0,02$ ; teste t pareado), procederam-se os experimentos com RMN. O estudo *in vitro* contou com a participação de 05 alunos voluntários do programa de pós-graduação em Odontologia da FO-UFRJ. Objetivando-se a homogeneização dos medicamentos com a saliva *in vitro*, adotou-se os seguintes critérios de inclusão: sem alterações sistêmicas e bucais como cáries e doença periodontal, sem fazer uso de medicamento no período de 6 meses prévios à coleta salivar e sem alimentar-se 2 horas antes da coleta. O estudo *in vivo* contou com os mesmos 05 alunos voluntários do programa de pós-graduação em Odontologia da FO-UFRJ para o bochecho com os medicamentos. Este estudo foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética do IESC (protocolo 43/08 estudo *in vitro*; protocolo 42/08 estudo *in vivo*; Anexo 5 e 6, páginas 88 e 89, respectivamente) e todos os participantes

assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 7 e 8 páginas 90 e 91, respectivamente).

Aos participantes dos estudos 1, 2 e 3 foi dispensado tratamento odontológico, quando indicado, conforme as necessidades encontradas. Foram realizados procedimentos preventivos como instruções sobre higiene bucal e orientações dietéticas, além de medidas preventivas como fluoroterapia. Aos pais e funcionários da creche-escola do IPPMG foram oferecidas palestras educativas sobre medidas de promoção de saúde bucal.

Todas as amostras (estudo 1, 2 e 3) foram centrifugadas (Centrifuge 5417C/5417R, Eppendorf, Hamburg-Germany) a 10.000g durante 60 minutos, a 4° C. Esta etapa objetivou a remoção de componentes não solúveis da amostra, além de grande parte dos microorganismos. O sobrenadante foi transferido em alíquotas de 700µL para três tubos (Eppendorffs, Hamburg-Germany) que, por fim foram armazenadas no congelador a -80 °C até o momento da análise em RMN (Silwood, Lynch *et al.*, 2002), temperatura suficientemente baixa para que a degradação se mantenha desprezível. Para controle interno experimental, avaliou-se o tempo de degradação da amostra, visto que experimentos bidimensionais duram longos períodos, assim torna-se necessário o estudo da degradação de metabólitos em função do tempo (Apêndice 3, página 95).

A amostra final era composta de 600µL, sendo 50µL de água deuterada (D<sub>2</sub>O; Cambridge Isotope Laboratories inc., USA) e 10µL de solução de 3-Trimetilsilil propionato de sódio a 5mM. (TPS; Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) ou para a interação com o medicamento, 10µL de solução de Dodecil Sulfonato de Sódio a 5mM (DSS; Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA). D<sub>2</sub>O é a referência

para o alinhamento do campo magnético com a amostra (lock). TSP ou DSS é a referência para o deslocamento químico de hidrogênio,  $\delta = 0$  ppm. Os espectros foram obtidos em um aparelho de RMN 400 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), a 25°C.

O presente estudo avaliou o perfil metabólico salivar em diferentes condições utilizando como ferramenta a RMN. Nos experimentos de RMN de alta resolução com ondas pulsadas, os sinais de decaimento livre de indução (FID - *Free Induction Decay*) de vários pulsos podem ser somados (Scans), a fim de obter-se uma melhor relação sinal/ruído e, conseqüentemente, uma melhor resolução do espectro de RMN. No presente estudo, padronizou-se 1024 scans para o hidrogênio. Utilizou-se ainda a seqüência de pulso PRESAT para a pressaturação do sinal da água (localizado a 4.7 ppm).

Preconizou-se o protocolo utilizado por Silwood et al. 2002, cujo assinalamento foi utilizado como referência para o presente estudo associado ao banco de dados Human Metabolome Database<sup>1</sup>. Os dados de intensidade de cada pico de hidrogênio do espectro 1D-<sup>1</sup>H CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) foram extraídos por meio de um programa computacional (AMIX, Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) e processados estatisticamente. Algumas amostras também foram submetidas à técnica <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-TOCSY para visualização de ambigüidades.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se na medida da absorção da radiação eletromagnética por um núcleo atômico, com

---

<sup>1</sup>Human Metabolome database ([http://www.hmdb.ca/search/spectra?type=nmr\\_search](http://www.hmdb.ca/search/spectra?type=nmr_search)) é um banco de dados que contem informações detalhadas sobre mais de 7900 metabólitos encontrados no corpo humano. Destina-se a ser utilizado para aplicações em metabolômica, química clínica, descoberta de biomarcadores e educação geral. O banco de dados contem link ou dados como: 1- características químicas, 2- características clínicas e 3- biologia molecular / bioquímica de dados.

spin diferente de zero, sob a influência de um campo magnético (Abraham e Loftus, 1978). A RMN é um fenômeno que pode ser observado em qualquer isótopo que apresente números quânticos de spin, como por exemplo o  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e o  $^{15}\text{N}$  que possuem número de spin  $I=1/2$ , podendo assumir dois estados quânticos magnéticos distintos, a saber  $+1/2$  ou  $-1/2$  (Abraham e Loftus, 1978; Gil e Geraldles, 1987). As transições entre os estados de energia podem ocorrer por emissão, ou absorção de radiação eletromagnética de frequência. Um núcleo interage com uma radiação eletromagnética na qual a frequência depende efetivamente do campo aplicado e da natureza do núcleo.

Para que ocorra o fenômeno de RMN é necessário perturbar o sistema através da aplicação de um pulso de radiofrequência, perpendicular ao campo magnético estático. Quando um núcleo, ou partícula absorve uma energia de radiofrequência o vetor de magnetização será rotacionado, distante do seu estado de equilíbrio (Sanders e Hunter, 1994).

Após a excitação, a amostra voltará gradualmente ao seu estado de equilíbrio inicial, através de uma série de processos chamados de relaxação. Durante o intervalo de tempo entre cada pulso, um sinal de radiofrequência, no domínio do tempo, chamado de sinal de FID é emitido pelos núcleos à medida que eles relaxam e retornam ao seu estado de menor energia ( $m = + 1/2$ ) (Abraham e Loftus, 1978).

Ao avaliar uma molécula, os núcleos de hidrogênio localizam-se em regiões de densidade eletrônica maior do que em outros, dessa forma alguns prótons tendem a absorver energia em campos magnéticos de intensidades ligeiramente diferentes, resultando em sinais de RMN em diferentes regiões do espectro, resultando em diferentes deslocamentos químicos (Gil e Geraldles,



1987). Porém, a intensidade do campo em que a absorção ocorre depende sensivelmente das ligações químicas vizinhas de cada próton, por modificarem de forma diferente o campo magnético.

Para um determinado campo magnético externo, um próton que está fortemente protegido pelos elétrons não pode absorver a mesma energia que um próton de baixa proteção. Um próton protegido ou blindado absorverá energia num campo externo de maior intensidade, frequências mais elevadas. Desta forma será então necessário um campo externo mais intenso para compensar o efeito do pequeno campo induzido (Sanders e Hunter, 1994).

O grau de proteção do próton pelos elétrons adjacentes dependerá da densidade eletrônica em torno desse próton e esta depende da presença de grupos vizinhos eletronegativos. A proximidade dos prótons a esses grupos influenciará diretamente no seu grau de blindagem (proteção). Quanto mais próximo destes grupos, menos blindado estará o próton. O próton do hidrogênio é o mais desblindado, portanto este elemento é o que mais sofre influência do campo magnético, sendo vantajosa a avaliação deste elemento, além do fato de estar em abundância na natureza (99,98%).

Em um espectro de RMN, os sinais podem resultar em picos únicos ou singletos, mas podem resultar em dupletos, tripletos, quadripletos, etc. Esta apresentação dos picos está relacionada com o chamado acoplamento escalar ou spin-spin. Este fenômeno ocorre quando núcleos de diferentes ambientes eletrônicos estão próximos entre si. Os deslocamentos químicos são medidos na escala horizontal do espectro, em Hertz (Hz), e normalmente expressos em partes por milhão (ppm), pois os deslocamentos associados são muito pequenos quando comparados com a intensidade do campo magnético

externo. Quanto mais para esquerda se localiza o sinal, menor é o campo magnético sobre o núcleo (Gil e Geraldés, 1987; Sanders e Hunter, 1994).

## **4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

**4.1 ARTIGO 1:** NMR metabolomic analysis of whole saliva from healthy children.

**4.2 ARTIGO 2:** NMR salivary metabolites components analysis from children with and without caries lesion.

**4.3 ARTIGO 3:** Local effect of an antihistaminic-containing syrup in salivary metabolites. An *in vitro* and *in vivo* evaluation.

## 4.1 ARTIGO 1

### **NMR metabolomic analysis of whole saliva from healthy children**

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo<sup>1</sup>

Elicardo Gonsalves<sup>2</sup>

Raquel Pinheiro dos Santos<sup>1</sup>

Adriane Mara de Souza Muniz<sup>3</sup>

Fabio Lacerda de Almeida<sup>4</sup>

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza<sup>1</sup>

Liana Bastos Freitas-Fernandes<sup>1</sup>

Ana Paula Valente<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>2</sup>School of Physics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Post-graduation, Army Physical Education School, EsEFEx, Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>National Center for Nuclear Magnetic Resonance – Jiri Jonas, Medical Biochemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

## ABSTRACT

In this work we evaluated the metabolites present in saliva of healthy children in different dentition stages by NMR. Unstimulated whole saliva samples from 50 healthy children aged from 3 to 13 years and separated according to the dentition stage, primary (n=15), mixed (n=18) and permanent (n=17) were analyzed.  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired and processed on a Bruker 400 MHz Advance spectrometer. Principal component analysis (PCA) was used for statistical analysis of resonance intensities. The standard distance was used to separate dentition groups. The metabolites gamma-aminobutyric acid, proline, ethanol, propane-1,2-diol, propionate and valine presented differences among dentitions ( $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey's test). The present work identified significant differences in the metabolite profiles among dentitions. These changes may also be influenced by the pre-pubertal period. The knowledge of the salivary metabolite profiles of healthy children is a standard data set for future investigations of salivary biomarkers for oral and systemic disorders.

**Key words:** Whole saliva, Children, Magnetic Resonance Spectroscopy, Metabolomic, Principal component analysis.

## INTRODUCTION

Salivary components come from salivary glands, cellular debris, microorganisms and crevicular fluid from plasma filtration. Previous studies have also shown that there is a direct relationship between saliva composition and blood components (Englander et al., 1963; Yan et al., 2009). The salivary components can be classified as high molecular weight, such as proteins and proteoglycans and low molecular weight components or metabolites. Successful strategies have been employed to study high molecular weight saliva showing individual differences in protein composition (Helmerhorst and Oppenheim, 2007). These differences were also correlated to specific diseases, for instance, Streckfus and collaborators identified increased levels of specific proteins in breast cancer patients saliva (Streckfus et al., 2006). Therefore, saliva components can be used as biomarkers for different oral and systemic conditions (Helmerhorst and Oppenheim, 2007). Biodiagnostics based on salivary biomarkers has several advantages; such as low costs, safety and is a non-invasive method (Lindon et al., 2004).

High-resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been employed to study complex biofluids such as plasma (Lenz et al., 2003), urine (Keun et al., 2002) and recently human saliva (Silwood et al., 2002a; Silwood et al., 2002b). The ability to evaluate differences without any prior purification transformed NMR an interesting technique to search differences in these biofluids in diverse physiological and pathological conditions.

For proper statistical analysis a robust method should be used and Principal Component Analysis (PCA) has been successfully applied to this type of study (Ramadan et al., 2006; Takeda et al., 2009). A useful method to

analyze metabolomic data is the principal component analysis (PCA). PCA is a statistical technique used to reduce dimensionality of a data set with a large number of interrelated variables (Jolliffe, 2002). In plasmatic components, PCA was able to separate subjects with severe atherosclerosis and with normal coronary arteries (Brindle et al., 2002).

Only few studies have evaluated salivary metabolite profile in different oral or systemic condition (Atkinson and Fox, 1993; Nagler et al., 2002; Siqueira et al., 2007). Furthermore, the investigation of salivary metabolites from children considering the stage of dentition has not been evaluated by any biochemical method. In an attempt to investigate modifications that may occur especially during the pre-pubertal period, and to create a gold standard for future comparisons, we evaluated possible differences in the salivary NMR profile of healthy children with primary, mixed and permanent dentition using PCA.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Sample Collection and Preparation***

Fifty healthy children attending the Pediatric Dentistry Clinic at the Federal University of Rio de Janeiro for regular dental care were recruited. These subjects ranged in age from 3 to 13 years old, none of them had any active periodontal disease, dental caries (dmft/DMFT=0), systemic disease and none were taking systemic antibiotics or had used anti-bacterial toothpaste in the six months before sample collection. The 3 mL of unstimulated whole saliva was expectorated into a plastic universal tube in the morning period. The samples were separated according to dentition stage, primary (n=15, mean age=4.27 ± 1.27, 11 female and 4 male), mixed (n=18, mean age=7.94 ± 2.09, 9 female

and 9 male) and permanent (n=17, mean age=10.88 ± 1.05, 9 female and 8 male) dentition. Each subject was also requested to refrain completely from oral activities (*i.e.*, eating, drinking, toothbrushing, oral rinsing, etc.) during the period between awakening and sample collection (~2 hours) (Silwood et al., 2002a). All samples were centrifuged at 10,000g and 4°C, and the supernatants were stored at –80°C until NMR analysis.

The use of human materials according to an informed consent protocol was approved by the Local Research and Ethics Committee. The legal guardians of the children participating gave their consent.

### ***NMR Measurements***

NMR spectra were acquired using a Bruker 400 MHz Advance spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm high-resolution probe and operating at a frequency of 400.13 (<sup>1</sup>H) MHz.

Samples were prepared by mixing 0.45 mL of salivary supernatant, deuterium oxide (0.05 mL, providing a field frequency lock) and a 500 μM solution of sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3-2H<sub>4</sub>] propionate (TSP) for chemical shift reference of <sup>1</sup>H spectra, δ = 0.00 ppm. A control investigation showed that the samples of whole saliva were stable throughout the NMR acquisition period (data not shown). High-resolution <sup>1</sup>H NMR spectra was obtained, and based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H total correlation (TOCSY) experiments the major signals were unambiguously assigned consistent with earlier studies (Bertram et al., 2009; Silwood et al., 2002a).

NMR signals were determined over a defined range of frequency resonances called chemical shifts, defined by the differences of resonances of a specific substance and a defined standard substance, expressed in ppm. The



fine adjustment was carried out, without water suppression, by inspection of the free induction decay and the field-frequency was set by detecting the deuterium oxide signal. Saliva was analyzed using NMR spectroscopy and identified based on Silwood assignments (Silwood et al., 2002a) and Human Metabolome Database. Each spectral dataset was normalized to the total sum of the integrals to partially compensate for differences in concentrations.

### ***Statistical analysis***

The metabolite data were computed on the statistical program AMIX (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Saliva data were analyzed according to dentition stage: primary, mixed and permanent dentition. Each NMR spectrum was analyzed using integrating regions of equal bucket size of 0.01 ppm. Based on 2D experiments the major signals could be unambiguously assigned. The water region was excluded to eliminate variation. The datasets were stored in a matrix **E** with 50 rows (50 subjects) and 906 columns (906 chemical shifts). The dataset was normalized by pareto scaling (Ramadan et al., 2006). In this scale, the variable mean was subtracted from each variable (column of the data) and then each variable was divided by square root of the standard deviation.

Principal component analysis (PCA) was applied to the covariance matrix **S** (906x906) from **E** by the linear system (Jolliffe, 2002).

$$\mathbf{S}\mathbf{x}_p = \lambda_p \mathbf{x}_p$$

where  $\lambda$  is the eigenvalues of **S** ranked in decreasing order and **x** is the corresponding normalized eigenvectors or principal components (PCs). These PCs are independent waveform features, representing the loading factor applied to the corresponding sample of the original waveforms. The first PCs correspond to the largest sources of variation, being orthogonal to each other.

The screen plot selected the relevant PCs for the analysis. Datasets of PC vectors retained in the screen test were represented as data points in 2 dimensional loading plots. The PC scores of the permanent, mixed and primary dentition individuals correspond to the product of the respective eigenvector and the matrix **E**.

The standard distance proposed by Flury and Riedwyl (Flury and Riedwyl, 1986) was calculated including the selected PC scores in matrix **E**. This index represents the distance between each observation and the center of the ellipsis in the space of the PC scores from control subjects (permanent dentition), normalized by the variance of each parameter. To classify primary, mixed and permanent dentition individuals, the cut-off point between standard distance values from the permanent dentition subjects was obtained by logistic regression. The permanent dentition was chosen as control group as the primary and mixed dentitions constitute a transitory dentition. The classifier performance was assessed by the leave-one-out cross-validation technique, which provides a good indication of reliability in classification of small datasets. Therefore, the points-out of cut-off is considered subjects in primary or mixed dentition.

The ANOVA and Tukey's tests were used to compare differences among PC scores from primary, mixed and permanent dentition. The significance level was set at  $p = 0.05$ . All signal processing procedures and statistical tests were executed in Matlab 6.5 (The Mathworks, USA).

## RESULTS

Resonances that correspond to salivary components were assigned based on chemical shift reports available by Silwood (Silwood et al., 2002a) and the Human Metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>).

Fig. 1 shows the 400 MHz 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra of human saliva samples. There are clear differences in intensity of resonances that are related to different concentration of components in each sample.

Fig. 2A illustrates the PCA, which quantifies the multivariable boundaries that characterize metabolite profile that, in this case does not shown significant group separation. The first two principal components in the PCA explained 17.9% and 11.5% of the data variation, respectively. A total of 13 PCs, which explained 81.9% of the variation, were used. The PCA analysis showed that saliva presented inter-individual variability that was higher in the primary dentition.

Although PCA analysis showed that the data presented low metabolite inter-relation, we could see that the level some components were clearly different. Table 1 summarizes the information about the metabolites identified that changed with the dentition. The main difference between primary, mixed and permanent dentition occurs in valine, where primary dentition has more variation than mixed dentition ( $p = 0.017$ ) followed by the ones listed in Table 1.

Table 2 and Fig. 2B show the standard distance, which was used to assess the classifier's performance, by computing the area under the receiver. This index represents the distance between each observation and the center of the ellipsis in the space of the PC scores from control subjects (permanent dentition), normalized by the variance of each parameter (see Material and

Methods for details). The operating characteristic curve (AUC) was set at 0.933; overall accuracy was set at 0.938; sensitivity (correct classification of permanent dentition subjects) was set at 0.867 and specificity (correct classification of permanent dentition subjects) was set at 1.000. The cut-off was set at 4.48 for permanent dentition, the median primary dentition was 29.70 and mixed was 16.64. Reflecting the higher variability in the primary dentition, the standard distance show scattered and higher values, followed by the mixed and the permanent dentition show the smallest inter-individual variability.

## **DISCUSSION**

In the present study, metabolite data were determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and showed significant differences between dentitions. The saliva assay is a growing area of research with implications for basic and clinical settings. The proper evaluation starts with the construction of a data base in which the profile of healthy individuals shows a pattern that can be identified as normal. If differences in eating habits or oral hygiene interfere with the methodology used the results would be inconclusive. But in this case, despite the differences in age, dentitions stage, eating habits and oral hygiene the results could be analyzed properly. In our opinion, since the difference in dentitions was the feature able to select each group, all of them represent “normal saliva” profile.

Furthermore, inter-individual variation was higher in primary dentition; it was slight smaller in mixed and very small in permanent dentition. This small variation in the permanent dentition can be related to a stabilization of oral environment. Also, the NMR methodology alone may be not sensitive enough to

identify the differences and therefore, other methods could be used combined to permit the analysis of even more aspects of children saliva from different dentitions.

The analysis of metabolites that are different between each group gave interesting insights: 1- propano-1,2-diol, propionate and ethanol are considered microorganism metabolites (Arp, 1999), appear in low levels in primary dentition and in much higher levels in permanent dentition. This difference can be associated to eruption of permanent teeth and increased contact surfaces and therefore elevated bacterial sites associated (Gerardu et al., 2003); 2- Valine is an essential amino acid and probably originates from food. 3- Proline is a non-essential amino acid that is part of collagen that is an important component of dentine (Kukkola et al., 2003). In the present study, mixed dentition showed higher levels of proline than primary dentition, probably because in mixed dentition primary teeth are being reabsorbed with collagen rearrangement leading to the presence of high levels of proline in the oral cavity. 4- gamma-aminobutyric acid (GABA) appeared more expressively in permanent than in primary dentition. Silwood et al (Silwood et al., 2002a) reported GABA in adults saliva from and, in the present work, GABA was also found children saliva. GABA is an inhibitory neurotransmitter found in the nervous systems and is the chief inhibitory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system. (Mauch et al., 1993).

The ultimate trends of systems biology must be the integration of data acquired from living organisms at the genomic, protein, and metabolite levels and integrate the oral with the systemic environment (Lindon et al., 2006). Through the combination of sensitive and high-resolution approaches an

improved understanding of an organism's total biology will come along with a better understanding of the causes and progression of human diseases. Hence new and better targeted treatments can be developed giving improved personalized healthcare.

## **CONCLUSION**

In conclusion, differences among primary, mixed and permanent dentition were identified. This study provides important information concerning salivary metabolites of children in the pre-pubertal period and the differences among healthy dentitions that could support future studies regarding oral and systemic disorders.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the funds from the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italy), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Universal, Processo 473866/2007-2, Brazil), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil), Millennium Institute of Structural Biology in Biotechnology and Biomedicine for the financial support.

## REFERENCES

Arp DJ (1999). Butane metabolism by butane-grown 'Pseudomonas butanovora'. *Microbiology* 145 ( Pt 5):1173-80.

Atkinson JC, Fox PC (1993). Sjogren's syndrome: oral and dental considerations. *J Am Dent Assoc* 124(3):74-6, 78-82, 84-6.

Bertram HC, Eggers N, Eller N (2009). Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Anal Chem* 81(21):9188-93.

Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, et al. (2002). Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 8(12):1439-44.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF (2007). Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383(1-2):30-40.

Englander HR, Jeffay AI, Fuller JB, Chauncey HH (1963). Glucose Concentrations in Blood Plasma and Parotid Saliva of Individuals with and without Diabetes Mellitus. *J Dent Res* 42(1246).

Flury BK, Riedwyl H (1986). Standard Distance in Univariate and Multivariate Analysis. *Am Stat* 40(3):249-251.

Gerardu VA, Buijs MJ, ten Cate JM, van Loveren C (2003). The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. *Caries Res* 37(5):369-73.

Helmerhorst EJ, Oppenheim FG (2007). Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res* 86(8):680-93.

Jolliffe IT (2002). Principal component analysis. . 2. ed. New York: Springer-Verlag.

Kaufman E, Lamster IB (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2):197-212.

Keun HC, Beckonert O, Griffin JL, Richter C, Moskau D, Lindon JC, et al. (2002). Cryogenic probe  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies. *Anal Chem* 74(17):4588-93.

Kukkola L, Hieta R, Kivirikko KI, Myllyharju J (2003). Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme. *J Biol Chem* 278(48):47685-93.

Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF (2003). A  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 33(5):1103-15.

Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK (2004). Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 9(1):1-31.

Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2006). Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm Res* 23(6):1075-88.

Mauch L, Abney CC, Berg H, Scherbaum WA, Liedvogel B, Northemann W (1993). Characterization of a linear epitope within the human pancreatic 64-kDa glutamic acid decarboxylase and its autoimmune recognition by sera from insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Eur J Biochem* 212(2):597-603.

Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ (2002). Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med* 50(3):214-25.

Ramadan Z, Jacobs D, Grigorov M, Kochhar S (2006). Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. *Talanta* 68(5):1683-91.

Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC (2002a).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 81(6):422-7.

Silwood CL, Grootveld M, Lynch E (2002b).  $^1\text{H}$  NMR investigations of the molecular nature of low-molecular-mass calcium ions in biofluids. *J Biol Inorg Chem* 7(1-2):46-57.



Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J (2007). Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist* 27(5):202-5.

Streckfus C, Bigler L, O'Bryan T (2002). Aging and salivary cytokine concentrations as predictors of whole saliva flow rates among women: a preliminary study. *Gerontology* 48(5):282-8.

Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M (2006). The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. *J Oral Pathol Med* 35(5):292-300.

Tager BN (1951). Endocrine problems in orthodontics; the concept of a relative metabolic insufficiency in bone due to rapid skeletal growth and slow sexual maturation. *Am J Orthod* 37(11):867-75.

Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, et al. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed*.

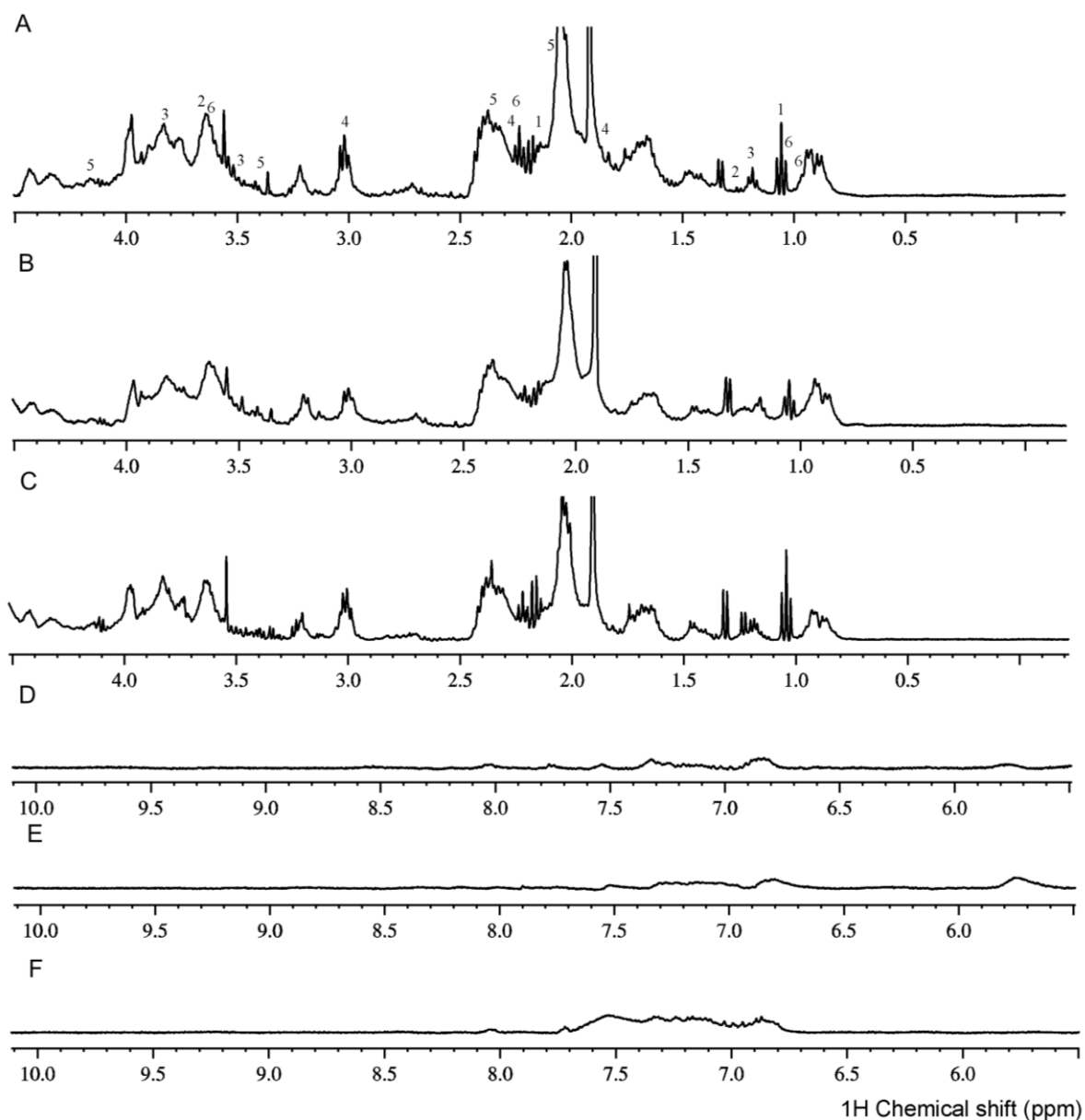
Wahllander A, Mohr S, Paumgartner G (1990). Assessment of hepatic function. Comparison of caffeine clearance in serum and saliva during the day and at night. *J Hepatol* 10(2):129-37.

Weise M, Eisenhofer G, Merke DP (2002). Pubertal and gender-related changes in the sympathoadrenal system in healthy children. *J Clin Endocrinol Metab* 87(11):5038-43.

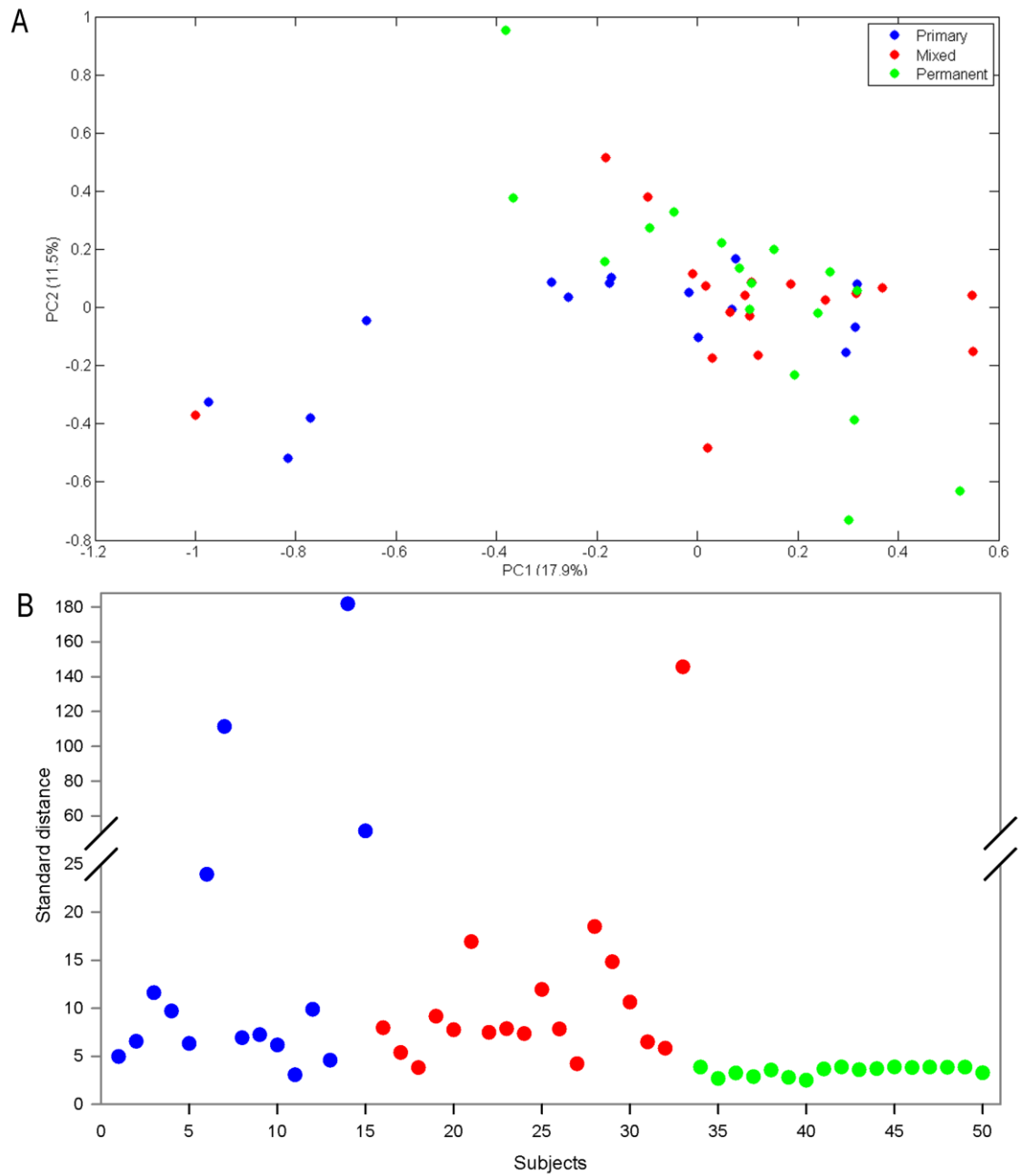
Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boontheung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. (2009). Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin Appl* 3(1):116-134.

Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary Transcriptomic Biomarkers for Detection of Resectable Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 138(3):949-957 e7.

## FIGURES



**Fig. 1:** Representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum of child saliva samples in the 0–4.5ppm (A,B,C) and 5.5–10.0ppm regions (D,E,F). A, D- Primary dentition; B, E- Mixed dentition; C, F- Permanent dentition. No statistical differences were found among dentitions in the 5.5-10.0ppm region. Assignments: 1- propionate, 2- ethanol, 3- propane-1,2-diol, 4- gamma aminobutyric acid, 5- proline, 6-valine.



**Fig. 2:** A- Principal components analysis shows no differences among dentitions; B- Standard distance showing low inter-individual variability in permanent dentition.

## TABLES

**Table 1:** Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ( $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey's test) detectable in 400 MHz.  $^1\text{H-NMR}$  spectra comparison between primary, mixed and permanent dentition.

Metabolites	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	H	Multiplicity*	Dentitions	$p$ -value
Gamma aminobutyric acid	1.88	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	m	Mixed>Primary Primary>Permanent	0.033 0.032
	2.29	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>	t		
	3.02	$\gamma$ -CH <sub>2</sub>	t		
Proline	2.07	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>	m	Mixed >Primary	0.033
	2.07	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	m		
	2.35	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	m		
	3.40	$\delta$ -CH <sub>2</sub>	m		
Ethanol	1.21	CH <sub>3</sub> -	t	Permanent>Primary Permanent>Mixed	0.024 0.028
	3.66	CH <sub>2</sub> OH	q		
Propane-1,2-diol	1.18	CH <sub>3</sub> -	d	Permanent>Primary Permanent>Mixed	0.036
	3.50	CHOH	d		
	3.86	CH <sub>2</sub> OH CHOH	m		
Propionate	1.04	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	t	Permanent>Primary	0.037
	2.17	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>	q		
Valine	0.97	CH <sub>3</sub>	d	Primary>Mixed	0.017
	1.02	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	m		
	2.28	$\beta$ -CH	m		
	3.64	$\alpha$ -CH	d		

\*Multiplicity indicates peaks quantity in  $^1\text{H-NMR}$  spectra (d-*duplet*, t- *triplet*, q- *quartet* and m- *multiplet*).  $\delta_{\text{H}}$ –  
Chemical shift.

**Table 2:** Standard distance for classify primary, mixed and permanent dentition.

<b>Primary dentition</b>	<b>Mixed dentition</b>	<b>Permanent dentition</b>
4,97	7,96	3,86
6,55	5,39	2,68
11,61	3,81*	3,25
9,70	9,16	2,87
6,33	7,76	3,56
23,93	16,93	2,80
111,37	7,48	2,51
6,93	7,87	3,68
7,24	7,35	3,88
6,17	11,95	3,60
3,06*	7,83	3,71
9,89	4,22*	3,88
4,59	18,50	3,82
181,86	14,83	3,86
51,36	10,63	3,85
	6,49	3,87
	5,83	3,27
	145,60	
$29,70 \pm 50,75^{**}$	$16,64 \pm 32,44^{**}$	$3,47 \pm 0,48^{**}$

*Standard distance= difference between dentitions. Cut-off point =*

*4.48. \*Indicates subjects out of cut-off; \*\* Media  $\pm$  Standard deviation.*

## 4.2 ARTIGO 2

### **NMR salivary metabolites components analysis from children with and without caries lesion**

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo<sup>1</sup>

Renata Angeli<sup>2</sup>

Adriane Mara de Souza Muniz<sup>3</sup>

Jurandir Nadal<sup>4</sup>

Liana Bastos Freitas-Fernandes<sup>1</sup>

Fabio Lacerda de Almeida<sup>2</sup>

Ana Paula Valente<sup>2</sup>

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>2</sup>National Center for Nuclear Magnetic Resonance of Macromolecules, Medical Biochemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Post-graduation, Army Physical Education School, EsEFEx, Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>4</sup>Biomedical Engineering Program, COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**ABSTRACT**

We tested the hypothesis that the Principal Component Analysis (PCA) and standard distance (SD) distinguish salivary biomolecules of caries lesion-free from caries-lesion subjects. Unstimulated whole saliva samples from children (3-12 years old) were collected and separated according to presence (n=18) and absence of caries lesion (n=15; dmft/DMFT index=0).  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired on a Bruker 400 MHz spectrometer. PCA was applied and SD was calculated and correlated with dmft/DMFT index; and F test to assess the metabolite differences between the groups ( $p < 0.05$ ). PCA was able to distinguish both groups and SD was smaller in caries lesion-free subjects. Lactate, lysine, glucose, glutamate, glutamine, propionate, ornithine and saturated fatty acid were higher in the caries lesion group ( $p < 0.05$ ). Choline and 4-hydroxyproline were higher in the caries lesion-free group ( $p < 0.05$ ). It was possible to distinguish the specific biomolecules from each group and to separate it using classificatory methods.

**Key words:** Whole saliva, Magnetic Resonance Spectroscopy, Principal component analysis, Metabolomic, Dental caries.

## INTRODUCTION

Whole saliva and its composition has an important biological function in maintaining oral health (Zehetbauer et al., 2009). Physiological, pathological, and environmental factor changes in salivary composition could be correlated to disease susceptibility. Hence, human saliva represents a potential source of novel diagnostic markers for oral diseases such as dental caries (de Almeida Pdel et al., 2008; Dodds et al., 2005; Hardt et al., 2005; Helmerhorst and Oppenheim, 2007). In the proteomic era most of the studies that correlate salivary composition with dental caries etiology and other oral diseases have used protein associations. Particularly in the cariology area, the presence or absence of these inherited markers have potential value to evaluate dental caries susceptibility in each human group (Hardt et al., 2005). However, saliva is a complex biofluid that is not only composed of proteins, therefore it is necessary to explore the other low molecular weight metabolite profiles (Grootveld and Silwood, 2005; Silwood et al., 2002a).

Low molecular weight organic metabolites, such as glucose, amino acids, lipids like fatty acids have been largely overlooked when using gas-liquid chromatography, column chromatography, and high performance liquid chromatography (Kaufman and Lamster, 2002; Tomita et al., 2008). Also these methods need specific information of the fluid under study. However, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy besides being a non-invasive method is able to identify many metabolites at the same time and constitutes a reproducible method (Kaufman and Lamster, 2002; Silwood et al., 2002a; Silwood et al., 2002b; Tomita et al., 2008).



A useful method to analyze metabolomic data is the principal component analysis (PCA). PCA is a multivariate statistical technique used to reduce the dimensionality of a data set with a large number of interrelated variables (Jolliffe, 2002). It is used to group metabolites from different conditions and classifies subjects (Holmes and Antti, 2002). In a previous work, we used successfully NMR and PCA to analyze healthy children with different dentitions (Fidalgo et al., 2010). As far as we know, salivary metabolites from caries individuals have not been studied using NMR spectroscopy and PCA. Here, we tested the hypothesis that Principal Component Analysis and Standard distance distinguish  $^1\text{H}$  NMR salivary biomolecules of caries lesion-free from caries-lesion individuals.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Sample Collection and Preparation***

Thirty three children with mixed dentition attending the Pediatric Dentistry Clinic at the Federal University of Rio de Janeiro were recruited. These subjects ranged in age from 3 to 12 years old, none of them had any periodontal disease or systemic disease and had not taken any systemic antibiotics or had been using anti-bacterial toothpaste in the six months prior to sample collection. A visual-tactile examination of each subject was performed by a single examiner. A primary and permanent Decayed Missing and Filled Surfaces (dmft/DMFT) index was calculated for each subject and they were separated according to the presence (n=18) or absence of caries lesion with dmft/DMFT index as 0 (n=15). A 3 mL of unstimulated whole saliva was expectorated (~5 minutes) into a plastic universal tube in the morning. Each subject was also requested to refrain

from oral activities (*i.e.*, eating, drinking, toothbrushing, oral rinsing) during the period between awakening and sample collection, about 2 hours (Silwood et al., 2002a). All samples were centrifuged at 10,000g and 4°C, and the supernatants were stored at -80°C until NMR analysis. The use of human materials was approved by the proper Research Ethics Committee of Community Health Studies.

### ***NMR Measurements***

NMR spectra were acquired using a Bruker 400 MHz Advance spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm high-resolution probe and operating at a frequency of 400.13 (<sup>1</sup>H) MHz and a probe temperature of 25°C.

Samples were prepared by mixing 0.45 mL of salivary supernatant, deuterium oxide (0.05 mL, providing a field frequency lock) and a 500 μM solution of sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] propionate (TSP) for chemical shift reference of <sup>1</sup>H spectra, δ = 0.00 ppm. A control investigation showed that the samples of whole saliva were stable throughout the NMR acquisitional period (data not shown). High-resolution <sup>1</sup>H NMR spectra could be obtained, and based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H total correlation (TOCSY) experiments the major signals could be unambiguously assigned consistent with earlier studies (Bertram et al., 2009; Silwood et al., 2002a).

NMR signals were determined over a defined range of frequency resonances called chemical shifts expressed in ppm. Saliva was analyzed using NMR spectroscopy and assignments were identified based on Silwood et al (Silwood et al., 2002a) and Human Metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>).

Each spectral dataset was normalized to the total sum of the integrals to partially compensate for differences in concentrations.

### ***Statistical analysis***

The metabolite data were computed on the statistical program AMIX (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Each NMR spectrum was reduced to a smaller number of variables, calculated by integrating regions of equal bucket size of 0.01 ppm. The water region was excluded. The datasets were stored in a matrix **E** with 33 rows (33 subjects) and 906 columns (906 chemical shifts). The matrix was normalized by pareto scaling (accuracy= 0.94, sensibility= 0.93, specificity= 0.94) (Ramadan et al., 2006). Principal component analysis (PCA) was applied to the covariance matrices **S** (906x906) from each **E**, by linear system (Jolliffe, 2002):

$$\mathbf{S}\mathbf{x}_p = \lambda_p \mathbf{x}_p$$

where  $\lambda$  is the eigenvalues of **S** ranked in decreasing order and **x** is the corresponding normalized eigenvectors or principal components (PCs). These PCs are independent waveform features, representing the loading factor applied to the corresponding sample of the original waveforms. The first PCs correspond to the largest sources of variation, being orthogonal to each other. The screen plot selected the relevant PCs for the analysis. Datasets of PC vectors retained in the screen test were represented as data points in 2 dimensional loading plots. The PC scores of the permanent, mixed and primary dentition individuals correspond to the product of the respective eigenvector and the matrix **E**.

The standard distance (SD) proposed by Flury and Riedwyl (Flury and Riedwyl, 1986) was calculated including the selected PC scores in matrix **E**.

This index represents the distance between each observation and the center of the ellipsis in the space of the PC scores from caries lesion-free subjects. To classify caries lesion-free and caries lesion subjects, the cut-off point between SD values from the caries lesion-free and caries lesion subjects was obtained by logistic regression. The classifier performance was assessed by the leave-one-out cross-validation technique (Breiman et al., 1998). Therefore, the points-out of this cut-off is considered subjects in primary or mixed dentition.

The Wilcoxon rank-sum test was used to compare standard values from caries lesion-free and caries lesion subjects. The F test was performed to compare the chemical shifts that contributed to separation between groups. The significance level was set at 5%. All signal processing procedures and statistical tests were executed in Matlab 6.5 (The Mathworks, USA).

## RESULTS

The caries lesion-free group was made up of 18 children (mean age=7.94  $\pm$  2.09, 9 female and 9 male) The caries lesion group was made up of 15 children (n=15, 7.23  $\pm$  2.01, 6 female and 9 male). All children had mixed dentition.

The  $^1\text{H}$  NMR spectra of caries lesion and caries lesion-free saliva with several resonances identified is shown in Fig. 1. Each different chemical shift corresponds to a salivary component. There are differences in intensity of resonances between caries lesion-free and caries lesion subjects.

The screen test retained 10 PCs in the analysis, which explained 86.13% of the total variation. The first third and fourth PC scores presented statistical difference between groups. The scatter plot formed by the third PC score versus the fourth PC score, revealed differences caries lesion-free and caries-

lesion samples areas (Fig. 2A). The classification was mainly carried out by the third PC score plane when the most caries-lesion subjects were placed in the left side of the graphic.

Ten PCs scores were used to calculate the SD. The cut-off point calculated by logistic regression was 3.98. The caries-lesion free subjects presented the SD mean statistically lower than caries-lesion subjects (Fig. 2B; Table 1). Only one subject from caries-lesion group presented SD lower than cut-off point. In the other hand, caries lesion-free subjects presented only one subject sample upper than 3.98. In both cases, it was not found any particularity of these individuals. Additionally, it was not found statistical correlation neither from SD and dmft/DMFT ( $p=0.45$ ) nor number of teeth with caries-lesion ( $p=1.10$ ).

The loadings of the 10 PCs which most influenced the separation of the groups are summarized in Table 2.

## **DISCUSSION**

To the best of our knowledge this is the first time that caries lesion and caries lesion-free saliva samples have been evaluated using NMR based metabolomics. High-resolution  $^1\text{H}$  NMR spectra were obtained, and based on 2D experiments, the major signals could be unambiguously assigned (Silwood et al., 2002a). Several differences in some regions of  $^1\text{H}$  NMR spectra between caries lesion and caries lesion-free subjects were found. The study of salivary metabolites is growing. There is a particular interest in establishing biomarkers related to health, which can then be used as diagnostic tools (Bertram et al., 2009). For this reason it is important to establish the salivary metabolites of caries lesion-free subjects.

The high-resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy datasets are represented as complex matrices with hundreds of proton signals originating from the various metabolites. These complexities can be untangled using chemometric methods that are used to reduce the size of the  $^1\text{H}$  NMR data for visualization purposes and to identify inherent patterns among sets of spectral measurements (Ramadan et al., 2006). Principal components (PCs) are new variables created from linear combinations of the starting spectra descriptors with appropriate weighting coefficients. In the present study PC3 and PC4 contributed most to the separation of the two groups and were able to separate caries lesion-free subjects demonstrating a satisfactory model.

SD is a multivariate statistical method to quantify the extent by which an experimental condition deviates from that of an unimpaired control (Schutte et al., 2000). In our study, SD is computed using PCA as standard multivariate statistical technique. The classifier model, calculated by the leave-one-out approach, showed a good accuracy. Although a direct relationship between SD and dmft/DMFT or number of teeth with caries lesion was not found. However it is possible that the SD of the groups not only verified the presence or absence of caries, but also determined an individual's susceptibility to caries lesion, when combined with other factors.

Metabolites such as propionate lactate, n-butyrate and n-caproate are probably metabolites from oral microorganisms and for that reason caries lesion subjects have an increase of these metabolites. On the other hand, choline and ornithine are probably endogen metabolites. Thus, the presence or absence of endogen biomarkers will be of great value for evaluating susceptibility of dental caries. Sucrose has been considered the most cariogenic carbohydrate due to

the increased porosity of dental plaque matrix formed in its presence (van Houte, 1994). This disaccharide is composed of glucose and fructose; several oral microorganisms low the pH of dental plaque in presence of glucose (Fejerskov et al., 1992; Vadeboncoeur and Pelletier, 1997). In the current study, lower amounts of sucrose but higher amounts of  $\alpha$ -glucose were found in the caries lesion than the caries lesion-free subjects, indicating that sucrose was decomposed by oral microorganisms in individuals that presented more caries susceptibility into  $\alpha$ -glucose for energetic metabolism (Vadeboncoeur and Pelletier, 1997).

Hexogen metabolites were identified in saliva from both caries lesion and caries lesion-free subjects. Although, individuals were requested to refrain from oral activities before sample collection, sodium dodecyl sulfate was identified. Lauryl sulfates help clean the teeth, and provide foam that helps to carry away debris (Petersen et al., 2006). It is an ionic surfactant component that is widely used in toothpaste (Rantanen et al., 2003). It was found in caries lesion subjects in higher amounts, probably due to adsorption in dental biofilm and irregular surfaces of the caries lesions.

Different salivary protein profiles between caries lesion and caries lesion-free subjects have been described (Anderson and Mandel, 1982; Bergandi et al., 2007). According to Ayad et al (Ayad et al., 2000), proteolytic processing of parotid salivary proteins differs between individuals who have always been caries lesion-free and those who have experienced dental decay. These differences could be explained by differential expression of proteases, protease inhibitors or polymorphisms at potential proteolytic cleavage sites. Furthermore, Cowman et al (Cowman et al., 1979) reported that saliva from caries lesion-free

individuals differs both in the number and sensitivity of proteins susceptible to bacterial degradation, compared with saliva from caries active patients. We suggest that the same can occur with low-weight metabolites, as was seen in the present study. On the other hand, the literature shows a relationship between amino acids in plasma and saliva after a protein-rich test meal intake, did not observe a significant relation between the increase in concentration of these amino acids in venous plasma and whole saliva (Brand et al., 1997). There is also evidence that several salivary aminoacids do not originate from food or microorganism metabolites (Nagata et al., 2006).

According to Tomita et al (Tomita et al., 2008), lipid concentrations in parotid saliva from caries susceptible subjects were higher than those from caries resistant ones, and a difference in fatty acid composition was detected between them, corroborating our data. Although the current study analyzed whole saliva, saturated fatty acid was highest in caries lesion individuals. The variations in the lipid levels and fatty acid composition may be associated with those in caries development. It was put forward that fatty acid had been demonstrated in salivary mucous glycoprotein and covalently bound. The presence of the lipids on salivary pellicle on teeth surface increases the effect the caries development by inhibition of acid diffusion (Slomiany et al., 1989).

Much attention has been recently dedicated to methods able to detect small tooth lesions (Nyvad, 2004). The present study evaluated differences between salivary metabolites from caries lesion-free and caries lesion subjects. Caries susceptibility is an important addition to the delivery of non-surgical preventive care such as topical fluorides, and therefore should be studied. Further information is necessary to support the use of this methodology as a



susceptible, diagnostic and disease progress tool in dental caries and other oral health disorders.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the funds from the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italy), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Universal, Processo 473866/2007-2, Brazil), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil), Millennium Institute of Structural Biology in Biotechnology and Biomedicine for the financial support.

## REFERENCES

- Anderson LC, Mandel ID (1982). Salivary protein polymorphisms in caries-resistant adults. *J Dent Res* 61(10):1167-8.
- Ayad M, Van Wuyckhuysse BC, Minaguchi K, Raubertas RF, Bedi GS, Billings RJ, et al. (2000). The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *J Dent Res* 79(4):976-82.
- Bergandi L, Defabianis P, Re F, Preti G, Aldieri E, Garetto S, et al. (2007). Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries. *Eur J Oral Sci* 115(2):93-6.
- Bertram HC, Eggers N, Eller N (2009). Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Anal Chem* 81(21):9188-93.
- Brand HS, Jorning GG, Chamuleau RA, Abraham-Inpijn L (1997). Effect of a protein-rich meal on urinary and salivary free amino acid concentrations in human subjects. *Clin Chim Acta* 264(1):37-47.
- Breiman L, Friedman J, Olshen R, Stone C (1998). Classification and Regression Trees: Boca Raton: Chapman & Hall/CRC.
- Cowman RA, Schaefer SJ, Fitzgerald RJ, Rosner D, Shklair IL, Walter RG (1979). Differential utilization of proteins in saliva from caries-active and caries-free subjects as growth substrates by plaque-forming streptococci. *J Dent Res* 58(10):2019-27.

de Almeida Pdel V, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 9(3):72-80.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 33(3):223-33.

Fejerskov O, Scheie AA, Manji F (1992). The effect of sucrose on plaque pH in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active Kenyan children. *J Dent Res* 71(1):25-31.

Fidalgo TKS, Gonsalves E, Santos RP, Muniz AMS, Almeida FL, Souza IPR, Freitas-Fernandes LB, Valente AP. NMR Metabolomic Part I: Salivary Metabolites of Oral Healthy Children. *J Dent Res* (Submitted in 2010).

Flury BK, Riedwyl H (1986). Standard Distance in Univariate and Multivariate Analysis. *Am Stat* 40(3):249-251.

Grootveld M, Silwood CJ (2005). <sup>1</sup>H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1):1-5.

Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, Newport G, Agabian N, Prakobphol A, et al. (2005). Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* 44(8):2885-99.

Helmerhorst EJ, Oppenheim FG (2007). Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res* 86(8):680-93.

Holmes E, Antti H (2002). Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst* 127(12):1549-57.

Jolliffe IT (2002). Principal component analysis. . 2. ed. New York: Springer-Verlag.

Kaufman E, Lamster IB (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2):197-212.

Nagata Y, Higashi M, Ishii Y, Sano H, Tanigawa M, Nagata K, et al. (2006). The presence of high concentrations of free D-amino acids in human saliva. *Life Sci* 78(15):1677-81.

Nyvad B (2004). Diagnosis versus detection of caries. *Caries Res* 38(3):192-8.

Petersen FC, Assev S, Scheie AA (2006). Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells. *Arch Oral Biol* 51(8):665-71.

Ramadan Z, Jacobs D, Grigorov M, Kochhar S (2006). Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. *Talanta* 68(5):1683-91.

Rantanen I, Jutila K, Nicander I, Tenovuo J, Soderling E (2003). The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo. *Swed Dent J* 27(1):31-4.

Schutte LM, Narayanan U, Stout JL, Selber P, Gage JR, Schwartz MH (2000). An index for quantifying deviations from normal gait. *Gait Posture* 11(1):25-31.

Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC (2002a). <sup>1</sup>H and (<sup>13</sup>C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 81(6):422-7.

Silwood CL, Grootveld M, Lynch E (2002b). <sup>1</sup>H NMR investigations of the molecular nature of low-molecular-mass calcium ions in biofluids. *J Biol Inorg Chem* 7(1-2):46-57.

Slomiany BL, Murty VL, Mandel ID, Zalesna G, Slomiany A (1989). Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility. *Arch Oral Biol* 34(4):229-37.

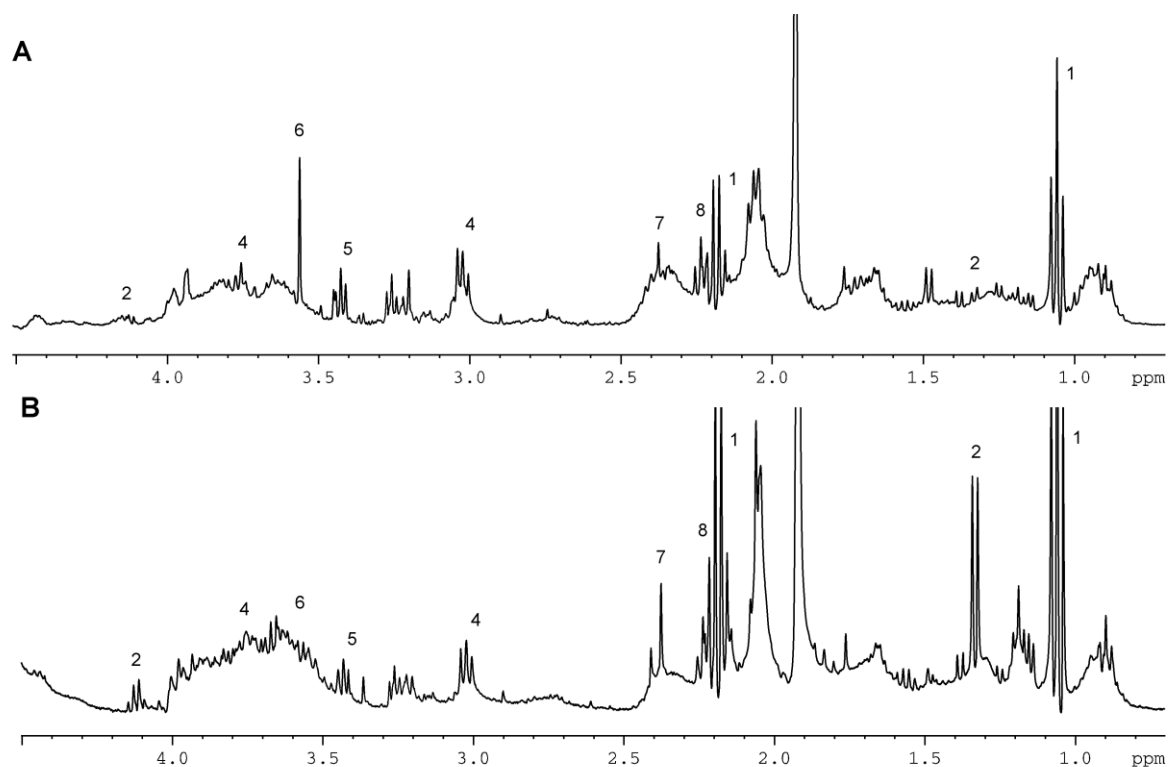
Tomita Y, Miyake N, Yamanaka S (2008). Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience. *J Oleo Sci* 57(2):115-21.

Vadeboncoeur C, Pelletier M (1997). The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 19(3):187-207.

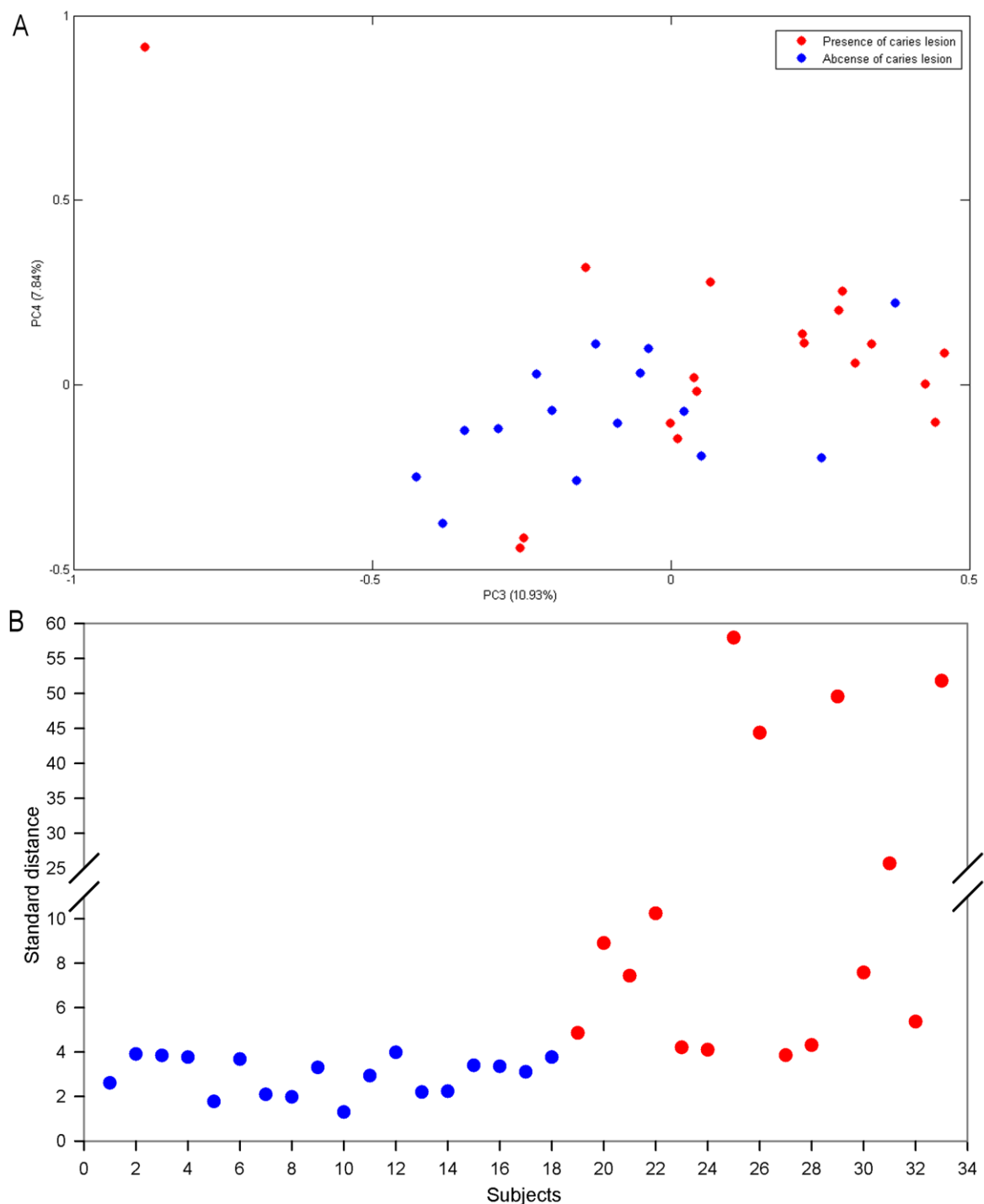
van Houte J (1994). Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73(3):672-81.

Zehetbauer S, Wojahn T, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S (2009). Resemblance of salivary protein profiles between children with early childhood caries and caries-free controls. *Eur J Oral Sci* 117(4):369-73.

## FIGURES



**Fig. 1:** Representative <sup>1</sup>H NMR spectra of whole saliva from caries-lesion free (A) and caries-lesion (B) child subjects demonstrating differences in metabolites (1- propionate, 2-lactate, 3-acetate, 4- ornithine, 5- 4-hydroxyproline, 6- sucrose, 7-  $\alpha$ -glucose and 8- 3-D-hydroxybutyrate).



**Fig. 2:** A- Scores plot of a two-component PCA model of  $^1\text{H}$  NMR spectra showing sample clustering according to presence or absence of caries-lesion. The percentage of variance captured by PC3 was 7.84% and PC4 was 10.93%. B- Standard distance showing that caries lesion-free subjects presented lower SD values than caries-lesion ones.

## TABLES

**Table 1:** The standard distance and the distances classifying caries-free lesion and caries-lesion individuals with respectives dmft/DMFT and number of teeth with

<b>Caries-lesion free</b>	<b>Caries-lesion</b>	<b>dmft/DMFT</b>	<b>Number of teeth with caries-lesion</b>
3.99*	57.97	3	3
3.91	51.80	9	9
3.85	49.54	5	5
3.77	44.37	5	4
3.77	25.67	7	7
3.68	10.24	5	2
3.40	8.90	1	1
3.36	7.58	5	4
3.31	7.43	6	5
3.11	5.37	5	4
2.94	4.86	4	3
2.61	4.31	5	5
2.20	4.21	2	2
2.24	4.10	7	2
2.10	3.86**	5	4
1.98			
1.78			
1.30			
$2.96 \pm 0.85^{\S}$	$19.35 \pm 20.58^{\S}$	$4.92 \pm 2.14^{\S}$	$4.00 \pm 2.24^{\S}$

*Cut-off=3.98; \*Upper than cut-off ; \*\*Lower than cut-off. <sup>§</sup>Media  $\pm$  Standard deviation*

**Table 2:** Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ( $p < 0.05$ ) detectable in 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectra comparison between caries-lesion and caries-lesion free children subjects.

Metabolites	$^1\text{H}$ Chemical Shift	Multiplicity*	Assignment	Caries-lesion free	Caries lesion	$p$ -value
Acetate	1.92	s	$\text{CH}_3$	↑	↓	0.020
$\alpha$ -galactose	3.70, 3.82, 3.82, 3.87, 3.97	m, m, dd, t, dd	$\text{H}_6', \text{H}_6, \text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4$	↓	↑	$p < 0.001$
$\alpha$ -glucose	3.84, 3.82, 3.74, 3.71, 3.53, 3.41	m, m, m, t, dd, t	$\text{H}_6, \text{H}_5, \text{H}_6', \text{H}_3, \text{H}_2, \text{H}_4$	↓	↑	$p < 0.001$
Choline	3.21	s	$-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$	↑	↓	0.008
Glutamine	3.81, 2.47, 2.14	t, m, m	$\alpha\text{-CH}, \gamma\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
Glutamate	2.10, 2.37, 3.79	m, m, t	$\beta\text{-CH}_2, \gamma\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}$			0.004
Glycerol	3.55, 3.63, 3.78	dd, dd, m	$-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}, -\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}, \text{CHOH}$	↑	↓	0.033
Lactate	1.33, 4.13	d, q	$\text{CH}_3, \text{CH}$	↓	↑	$p < 0.001$
Lysine	1.49, 1.73, 1.90, 3.01, 3.76	m, m, m, t, t	$\gamma\text{-CH}_2, \delta\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2, \text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}$	↓	↑	0.002
Mannitol	3.67, 3.75, 3.79	dd, m, d	$\text{CH}_2\text{OH}$ (C1/C6), H2 and H5, H-3 and H-4	↓	↑	$p < 0.001$
Propionate	1.04, 2.17	t, q	$\beta\text{-CH}_3, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
Provitamin B5	0.93, 1.78, 3.34, 3.49, 3.68, 4.01	s, m, t, s, t, s	$\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{NH}, -\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{OH}, -\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CHOH}(\text{CONH})$	↓	↑	0.003
N-caproate	0.83, 1.35, 1.58, 2.15	t, m, m, t	$-\text{CH}_3, \gamma, \delta\text{-CH}_2\text{'s}, \beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	0.001
N-valerate	0.85, 1.40, 1.58, 2.15	t, m, m, t	$\delta\text{-CH}_3, \gamma\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
4-hydroxyproline	2.23, 2.47, 3.47, 4.46	m, m, m, m	$\gamma\text{-CHOH}, \beta\text{-CH}_2, \delta\text{-CH}_2\text{-NH}, \alpha\text{-CH}$	↑	↓	0.001
Saturated fatty acid	0.86, 1.28, 1.53, 2.18	t, m, m, t	$\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{-}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$	↓	↑	$p < 0.001$
Sodium dodecyl sulphate	0.92, 1.34, 1.71, 1.71, 4.00	t, m, m, m, t	$\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{-}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3^-, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$	↓	↑	$p < 0.001$

Sucrose	3.47, 3.56, 3.68, 3.76, 3.76, 3.76, 3.83, 3.83, 3.86, 3.89, 4.05, 4.22, 5.41	T, m, s, t, m, m, m, t, m, m, t, d, d	H <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>1'</sub> , H <sub>3</sub> , H <sub>6</sub> , H <sub>6'</sub> , H <sub>6''</sub> , H <sub>3</sub> , H <sub>5</sub> , H <sub>5</sub> , H <sub>4</sub> , H <sub>3'</sub> , H <sub>1</sub>	↑	↓	0.006
Thymol	1.25, 2.18, 3.18, 6.61, 6.66, 6.99	d, s, m, dd, s, dd	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH, CH <sub>3</sub> -Ar, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH, H <sub>6</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>5</sub>	↓	↑	p<0.001
3-D-hydroxybutyrate	4.13, 2.45, 2.34, 1.24	dd, dd, dd d	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> , CH	↑	↓	p<0.001
Ornithine	1.81, 1.95, 3.05, 3.80	m, m, t, t	γ-CH <sub>2</sub> β-CH <sub>2</sub> , δ-CH <sub>2</sub> , α-CH	↓	↑	p<0.001
Xylitol	3.64, 3.64, 3.72, 3.80, 3.86	m, dd, dd, m, dd	H <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> OH (C1/C5), CH <sub>2</sub> OH (C1/C5), H <sub>2</sub> and H <sub>4</sub> , CH <sub>2</sub> OH (C1/C6)	↓	↑	p<0.001

\*Multiplicity indicates peaks quantity in <sup>1</sup>H-NMR spectra (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet). Were used 10 PCs that explained 86.13% of variation to find out precisely which regions of the NMR spectra have caused the separation between groups. The respective metabolites that presented statistical differences (p<0.05; F test) are indicated. The metabolite α-galactose was identified in all 10 PCs.



### 4.3 ARTIGO 3

**Local effect of an antihistaminic-containing syrup in salivary metabolites.  
*An in vitro and in vivo evaluation.***

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo<sup>1</sup>

Liana Bastos Freitas Fernandes<sup>1</sup>

Fabio Lacerda de Almeida<sup>2</sup>

Ana Paula Valente<sup>2</sup>

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>2</sup>National Center for Nuclear Magnetic Resonance of Macromolecules, Medical Biochemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**ABSTRACT**

The effect of medicines-containing syrup on the tooth surface is largely studied in literature. On the other hand, few studies evaluate salivary metabolites changes. Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* local effect of an antihistaminic-containing syrup in salivary metabolites using high-resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. For *in vitro* interaction, unstimulated whole saliva from 5 healthy volunteers was collected and was *in vitro* mixture with an antihistaminic-containing syrup (Claritin<sup>®</sup>). For *in vivo* study, before sample collection, the same volunteers were instructed to rinse the mouth with Claritin<sup>®</sup> for 20 seconds. The *in vitro* and *in vivo* mixture were studied in  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired and processed on a Bruker 400 MHz Advance spectrometer. For statistical analysis was used principal analysis component (PCA) and paired t test ( $p < 0.05$ ). The metabolites acetate, histidine,  $\gamma$ -aminobutyrate, glutamate, isoleucine, phenylalanine, propionate, trimethylamine and valine presented lower concentration after antihistaminic interaction. The differences in salivary metabolites were found both *in vitro* and *in vivo* antihistaminic interaction. In addition, it was demonstrated that *in vitro* assays could be an alternative method for medicines and salivary interaction studies.

**Key words:** Saliva, Magnetic Resonance Spectroscopy, Chemistry, Pharmaceutical, allergy.

## INTRODUCTION

The human saliva is a complex mixture that carry out many important and well-recognized functions involved in oral health and the homeostasis of oral environment.<sup>1,2</sup> Changes in salivary composition and others local factors such as tooth anatomy, microbiology and adsorption on enamel topography is associated with disease susceptibility and it progression.<sup>3</sup>

The administration of liquid medicines is an additional factor that could influence oral homeostasis, promoting biochemistry alterations in salivary components and affecting tooth surface.<sup>4,5</sup> In addition, it continuous use may play a role in the cause of hiposalivation.<sup>6</sup> Pediatric medicines, generally, are prescribed in liquid formulation which includes sucrose to turn it more attractive. Although, the association between medicines-containing syrups and the caries experience are well described in literature.<sup>5,7</sup> In chronic diseases, the high frequency of medicines-containing syrups increases caries susceptibility.<sup>8</sup>

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is able to identify low molecular weight salivary metabolites. It analytical techniques are largely employed for metabolomic studies.<sup>9</sup> NMR is a nondestructive technique, widely used in chemistry, that provides detailed information on molecular structure, both for pure compounds and in complex mixtures, such as salivary fluid.<sup>10,11</sup>

Alterations in tooth surface are largely explored in literature,<sup>4,12</sup> although for the best of our knowledge the interaction between salivary metabolites and medicines was not studied. Thus, the aim of this study was to assess the *in vitro* and *in vivo* the influence of an antihistaminic-containing syrup in salivary metabolites using high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.

## **MATERIALS and METHODS**

### ***Subjects of study***

For *in vitro* and *in vivo* evaluation, 5 volunteers from Dental School that were not medically compromised were recruited. These subjects ranged in age from 24 to 30 years (mean age  $26.6 \pm 2.2$ ), none of them had not taking any systemic antibiotics or had not used anti-bacterial toothpaste six months before sample collection. After visual-tactile examination of each by a single examiner, was certified that none of them had any active periodontal disease or dental caries lesion.

### ***In vitro sample collection***

We asked the patients to collect whole saliva expectorated from the mouth (5 mL), into a plastic universal tube in the morning. Each patient was also requested to refrain from oral activities during the short period of 2 hours before sample collection (~ 5 min). Specimens were centrifuged at 10,000g and 4°C for 60 minutes immediately on their arrival to remove cells and debris, and the supernatants were then stored at -80°C until NMR analysis.<sup>13</sup> For *In vitro* interaction, previous NMR tests with antihistaminic-containing syrup (Claritin®; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil) were performed for establish ideal concentration of antihistaminic in saliva samples. Therefore, was used 5% of antihistaminic in a total of 0.45mL of mixture.

### ***In vivo sample collection***

Volunteers rinsed the mouth with 10ml of the antihistaminic-containing syrup (Claritin®; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil) for 20 seconds and then it was discarded. Immediately after it, whole saliva was expectorated from the mouth (5 mL), into another plastic universal tube. Specimens were

centrifuged at 10,000g and 4°C for 60 minutes and the supernatants were analyzed immediately.

### ***NMR analysis***

All samples of were prepared by taking 0.45 mL salivary samples, to 0.05 mL deuterium oxide (D<sub>2</sub>O; Cambridge Isotope Laboratories inc., USA) that provides a field frequency lock and 0.01 mL of Sodium 2,2-Dimethyl-2-Silpentane-5-Sulfonate solution 5.00 mM (DSS; Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) that is the chemical shift reference for <sup>1</sup>H spectra,  $\delta = 0.00$  ppm.

NMR spectra were acquired using a Bruker 400 MHz Advance spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm high-resolution probe and operating at a frequency of 400.13 (<sup>1</sup>H) MHz and a probe temperature of 25°C. NMR signals were determined over a defined range of resonance of frequencies called chemical shifts, defined by the differences of resonances of a specific substance and a defined standard substance, expressed in ppm. The fine adjustment was done with water suppression. Saliva was analyzed using NMR spectroscopy and assignment were identified based on Silwood et al.<sup>13</sup>

The use of human materials according to an informed consent protocol was approved by the Research Ethics Committee of Community Health Studies Institute from Federal University of Rio de Janeiro.

### ***Statistical analysis***

The metabolites data were analyzed on the statistical program AMIX (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Salivary data were compared before and after antihistaminic-containing syrup interaction. Each spectral dataset was normalized to the total sum of the integrals to partially compensate for

differences in concentrations and the matrix was normalized scaling dataset by pareto scaling.<sup>14</sup> Each NMR spectrum was reduced to smaller number of variables, calculated by integrating regions of equal bucket size of 0.05 ppm. The water region was excluded to eliminate variation. The datasets were stored in a matrix with 15 rows (15 of samples; 5 before antihistaminic interaction, 5 after *in vitro* and 5 after *in vivo* antihistaminic interaction) and 179 columns (179 chemical shifts). Principal component analysis (PCA) was applied with a confidence interval of 95%. The firsts PCs correspond to the largest sources of variation, being orthogonal to each other.

The paired t test was applied to compare differences among PC scores before and after *in vitro* and *in vivo* syrup interaction. The significance level was set to  $p = 0.05$ . All signal processing procedures and statistical tests were implemented in statistical program SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

## RESULTS

A sample <sup>1</sup>H NMR spectrum before and after *in vitro* and *in vivo* interaction with antihistaminic-containing syrup with several resonances identified is shown in Fig. 1. There are differences in intensity of resonances between after and before antihistaminic-containing syrup interaction, in demarked region. The *in vitro* and *in vivo* interaction demonstrated few differences, as shown in Fig.1B and Fig.1C.

PCA of <sup>1</sup>H NMR spectra of saliva subjects before and after antihistaminic-containing syrup interaction is presented in Fig. 2. For *in vitro* and *in vivo* study, was used four PCs that expressed more representative difference between groups and explained 95.13% of variation. The points are

mapped in the space spanned by PC1 versus PC2. The percentage of variance captured by PC1 was 80.46% and PC2 was 8.64%. PCA revealed the existence of differences in salivary metabolites when compared before and after *in vitro* and *in vivo* antihistaminic interaction.

The metabolites that presented statistical difference ( $p < 0.05$ ; paired t test) were represented in Table 1. The metabolites acetate, histidine,  $\gamma$ -aminobutyrate, glutamate, isoleucine, propionate and valine presented in lower concentration after antihistaminic interaction. Just 4-hydroxyproline not presented statistical difference between after anti-histaminic containing syrup and *in vitro* ( $p = 0.13$ ).

## DISCUSSION

Medicines are considered local factors that could change oral homeostasis, which could result in alteration of tooth surface. The continuous use of some medicines increase caries susceptibility.<sup>8</sup> Antihistamines are commonly used in treatment of respiratory allergies, especially in chronic allergies.<sup>15,16</sup> Accordingly, is important to study its interaction with salivary metabolites. In the present study, high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectra demonstrated metabolites' alterations when it interacts with antihistaminic-containing syrup both *in vitro* and *in vivo* evaluation.

PCA was able to separate spatially subjects with different conditions. Supervised models can reduce data dimensionality as PCs.<sup>17</sup> This statistical model is useful to classify samples correctly. In the current study, PCA plotting was able to separate metabolites before and after *in vitro* and *in vivo* antihistaminic interaction. NMR is a sensible and reproducible technique,<sup>9,13</sup>

even though the present study evaluated few numbers of sample, PCA was able to classify the different conditions.

In the present study, acetate, histidine,  $\gamma$ -aminobutyrate, glutamate, isoleucine, propionate and valine were statistically higher before antihistaminic *in vitro* and *in vivo* interaction. Some liquids medicines are chemically stable in low pH, as antihistaminic-containing syrup evaluated in the current study and generally citric acid is used for this propose.<sup>7</sup> Citric acid commonly acts as salivary stimulating agent, increasing salivary flow, and consequently metabolites could be diluted in saliva.<sup>18</sup> Even though, our study demonstrated that also *in vitro* evaluation there is a decreasing in concentration of metabolites above mentioned. For that reason, we speculate that the antihistaminic-containing syrup may interact with those metabolites, reducing its concentration in saliva.

Medicines for children patients are commonly prescribed in liquid formulation. It is generally sweetened and sucrose is the carbohydrate widely used for this purpose.<sup>7,19</sup> This fact characterizes these formulations as potentially cariogenic, once oral microorganisms ferment preferentially sucrose resulting in high acidogenic activity and consequently decrease dental plaque pH.<sup>5,7,20-23</sup> Furthermore, sucrose has been considered the most cariogenic carbohydrate due to the increased porosity of dental plaque matrix formed in its presence.<sup>24</sup> Our study demonstrated that  $\alpha$ -galactose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose, mannitol and sucrose were statistically higher after antihistaminic-containing syrup interaction. All those sugar are fermented by microorganisms, although mannitol, a sugar alcohol, is slowly fermented to acid by oral bacterial.<sup>25</sup>



An alternative to minimize tooth damage in children that frequently use antihistaminic-containing syrups, oral hygiene should be done after medicine administration.<sup>26</sup> This procedure will remove sugar from syrup and prevent development of dental caries. In addition, the use of topical fluoride agents are recommended.<sup>26,27</sup> Medicines-containing syrup administration during nocturnal period should be avoided, once salivary flow is naturally lower and its protective capacity is reduced.<sup>1,28</sup>

*In vitro* studies present a difficulty to reproduce the clinical environment, due to the presence of teeth and other oral tissues that makes this environment complex.<sup>1</sup> In the current study, the *in vitro* and *in vivo* interaction between human salivary components and antihistaminic-containing syrup demonstrated to be similar. Therefore, *in vitro* studies could be an alternative method to study medicines and salivary metabolites interaction.

## **CONCLUSION**

This study demonstrated that *in vitro* and *in vivo* salivary metabolites interaction with antihistaminic-containing syrup promotes similar changes in salivary metabolite profile.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the funds from the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italy), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ,

Brazil), Millennium Institute of Structural Biology in Biotechnology and Biomedicine for the financial support.

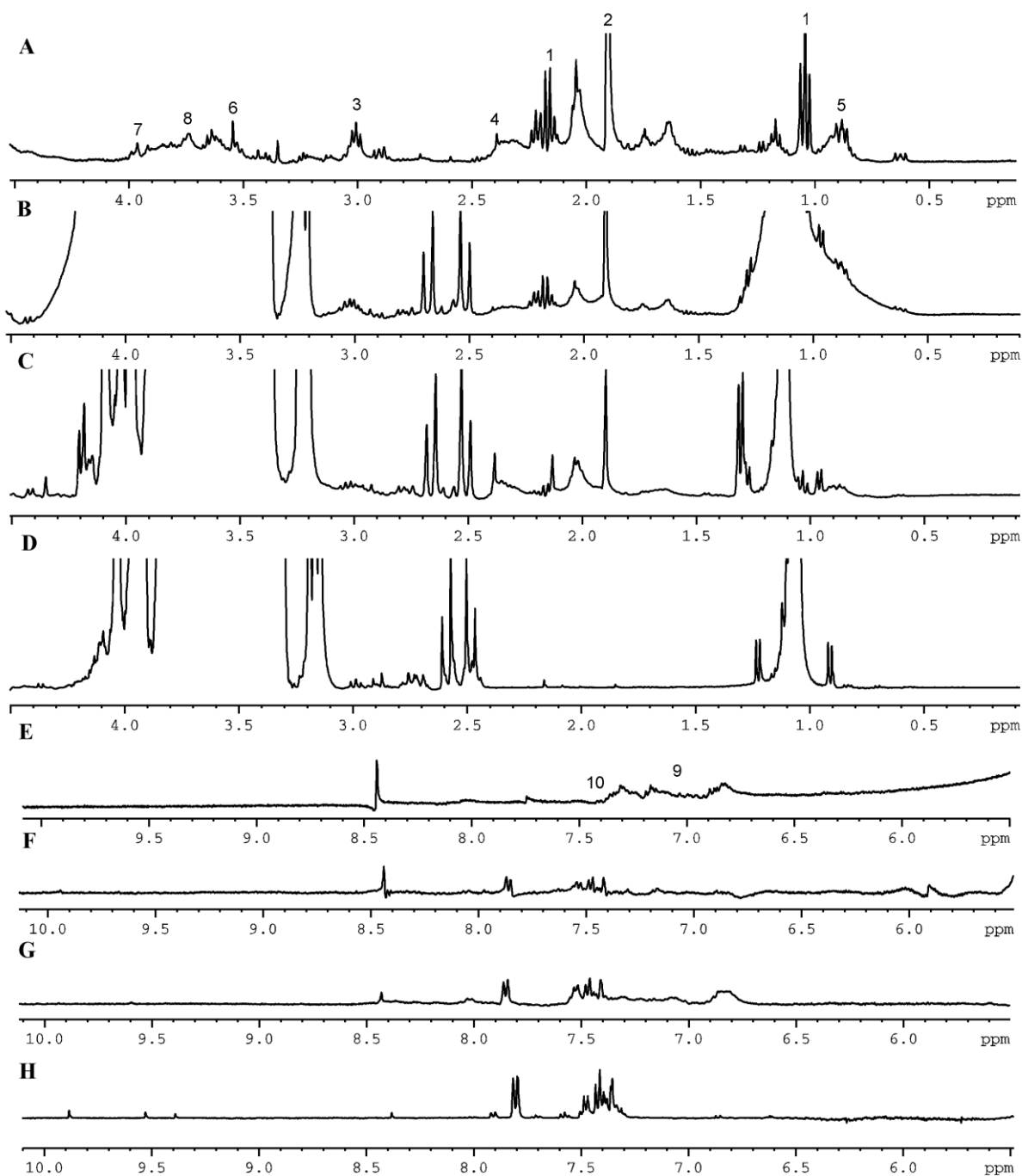
## REFERENCES

1. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85:162-169.
2. Lukacs JR, Largaespada LL. Explaining sex differences in dental caries prevalence: saliva, hormones, and "life-history" etiologies. *Am J Hum Biol* 2006;18:540-555.
3. Van Steijn GJ, Amerongen AV, Veerman EC, Kabanmoentalib S, Overdijk B. Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2002;37:245-249.
4. Costa CC, Almeida IC, Costa Filho LC. Erosive effect of an antihistamine-containing syrup on primary enamel and its reduction by fluoride dentifrice. *Int J Paediatr Dent* 2006;16:174-180.
5. Maguire A, Baqir W, Nunn JH. Are sugars-free medicines more erosive than sugars-containing medicines? An in vitro study of paediatric medicines with prolonged oral clearance used regularly and long-term by children. *Int J Paediatr Dent* 2007;17:231-238.
6. Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003;134:61-69; quiz 118-119.
7. Pierro VS, Abdelnur JP, Maia LC, Trugo LC. Free sugar concentration and pH of paediatric medicines in Brazil. *Community Dent Health* 2005;22:180-183.
8. Maguire A, Rugg-Gunn AJ. Medicines in liquid and syrup form used long-term in paediatrics: a survey in the Northern Region of England. *Int J Paediatr Dent* 1994;4:93-99.
9. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm Res* 2006;23:1075-1088.
10. Lins AP, Furlan M, Gastmans JP, Emerenciano Vde P. [Application of artificial intelligence techniques in organic chemistry. Study, by computer, of NMR <sup>13</sup>C of steroids]. *An Acad Bras Cienc* 1991;63:141-153.

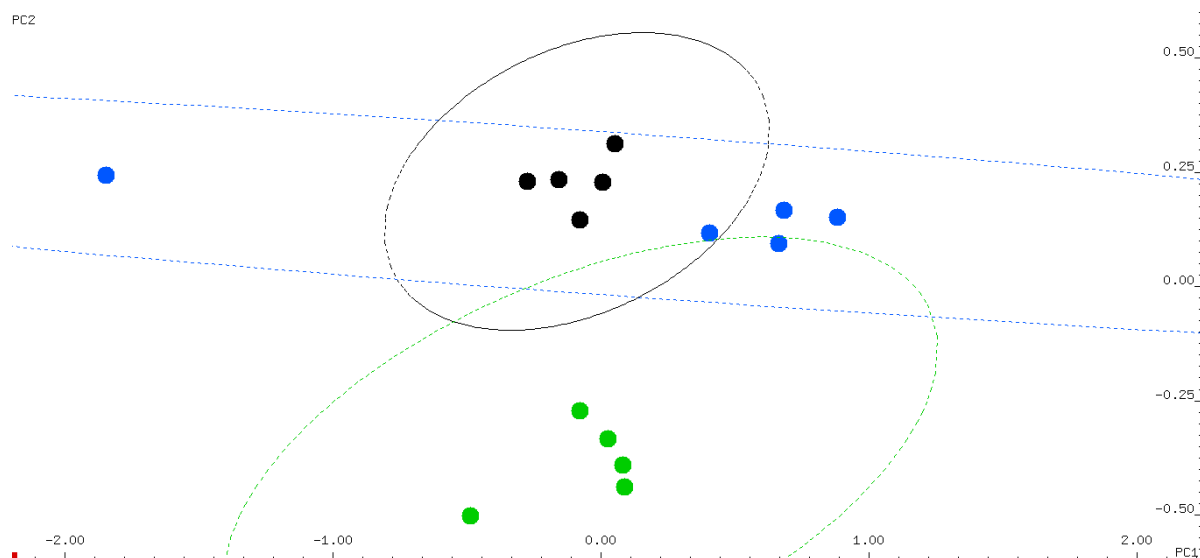
11. Liu M, Nicholson JK, Lindon JC. High-resolution diffusion and relaxation edited one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of biological fluids. *Anal Chem* 1996;68:3370-3376.
12. da Costa CC, Almeida IC, da Costa Filho LC, Oshima HM. Morphology evaluation of primary enamel exposed to antihistamine and fluoride dentifrice--an in vitro study. *Gen Dent* 2006;54:21-27.
13. Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC. <sup>1</sup>H and (<sup>13</sup>C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 2002;81:422-427.
14. Ramadan Z, Jacobs D, Grigorov M, Kochhar S. Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. *Talanta* 2006;68:1683-1691.
15. Ferrer M, Morais-Almeida M, Guizova M, Khanferyan R. Evaluation of treatment satisfaction in children with allergic disease treated with an antihistamine: an international, non-interventional, retrospective study. *Clin Drug Investig* 2010;30:15-34.
16. Chipps BE, Harder JM. Antihistamine treatment for allergic rhinitis: different routes, different outcomes? *Allergy Asthma Proc* 2009;30:589-594.
17. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 2002;8:1439-1444.
18. da Mata AD, da Silva Marques DN, Silveira JM, Marques JR, de Melo Campos Felino ET, Guilherme NF. Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow: a randomized controlled trial. *Oral Dis* 2009;15:220-228.
19. Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 2006;85:834-838.
20. Shaw L, Glenwright HD. The role of medications in dental caries formation: need for sugar-free medication for children. *Pediatrician* 1989;16:153-155.
21. Grenby TH. The effect of glucose syrup on dental caries in the rat. *Caries Res* 1972;6:52-69.
22. Fejerskov O, Scheie AA, Manji F. The effect of sucrose on plaque pH in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active Kenyan children. *J Dent Res* 1992;71:25-31.

23. Vadeboncoeur C, Pelletier M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 1997;19:187-207.
24. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994;73:672-681.
25. Edgar WM, Dodds MW. The effect of sweeteners on acid production in plaque. *Int Dent J* 1985;35:18-22.
26. McDonald JL, Jr., Stookey GK. Laboratory studies concerning the effect of acid-containing beverages on enamel dissolution and experimental dental caries. *J Dent Res* 1973;52:211-216.
27. Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 1994;28:227-232.
28. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:18S-24S.

## FIGURES



**Fig. 1:** Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of salivary metabolites components before and after syrup mouthwash subjects, demonstrating differences in regions of spectra. A,E – Spectra before syrup mouthwash; B,F – Spectra after *in vitro* antihistaminic interaction; C,G - Spectra after *in vivo* antihistaminic interaction; D,H – Spectra of antihistaminic. In the 0-4.5ppm (A,B,C, and D) could be identified metabolites that differed before and after antihistaminic interaction (1- propionate, 2-acetate, 3-  $\gamma$ -aminobutyrate, 4-glumatate, 5- isoleucine, 6-sucrose, 7-  $\alpha$ -galactose and 8-  $\alpha$ -glucose); and 5.5-10.0ppm (E,F,G and H) were indicated metabolites that differed before and after antihistaminic interaction (9-histidine and 10-phenylalanine).



**Fig. 2:** Scores plot of a two-component PCA model of  $^1\text{H}$ NMR spectra showing sample clustering before (●) and *in vitro* (●) and *in vivo* (●) antihistaminic interaction. The percentage of variance captures by PC1 was 80.46% and PC2 was 8.64%.

TABLE

**Table 1:** Resonance assignments of salivary metabolites components ( $p < 0.05$ ) before and after syrup mouthwash subjects.

Metabolites	$^1\text{H}$ Chemical Shift	Multiplicity*	Assignment	Control	Syrup interaction	p-value
Acetate	1.92	s	-CH <sub>3</sub>	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
$\alpha$ -galactose	3.70, 3.82, 3.82, 3.87, 3.97	m, m, dd, t, dd	H6', H6, H2, H3, H4	↓	↑	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
$\alpha$ -glucose	3.84, 3.82 3.74, 3.71 3.53, 3.41	m, m, m, t, dd, t	H6, H5, H6', H3, H2, H4	↓	↑	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
$\beta$ -glucose	3.24, 3.40, 3.47, 3.49, 3.72, 3.91, 4.65	dd, t, m, t, dd, dd, d	H2, H4, H5, H3, H6', H6, H1	↓	↑	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Histidine	3.15, 3.28, 3.98, 7.07, 7.80	dd, dd, dd, s, s	$\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\alpha$ -CH, H4, H2	↑	↓	0.01 <sup>a</sup> 0.02 <sup>b</sup>
$\gamma$ -aminobutyrate	1.88, 2.29, 3.02	m, t, t	$\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\alpha$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub>	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Glutamate	2.10, 2.37, 3.79	m, m, t	$\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\alpha$ -CH	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Isoleucine	0.94, 1.01, 1.47, 1.99, 3.68	t, d, m, m, d	CH <sub>3</sub> , $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\gamma$ -CH <sub>2</sub> , $\beta$ -CH, $\alpha$ -CH	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Mannitol	3.67, 3.75, 3.79, 3.86	dd, m, d, dd	CH <sub>2</sub> OH (C1/C6), H2 and H5, H-3 and H-4, CH <sub>2</sub> OH (C1/C6)	↓	↑	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Propionate	1.04, 2.17	t, q	$\beta$ -CH <sub>3</sub> , $\alpha$ -CH <sub>2</sub>	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
4-hydroxyproline	2.23, 2.47, 3.47, 4.46	m, m, m, m	$\gamma$ -CHOH, $\beta$ -CH <sub>2</sub> , $\delta$ -CH <sub>2</sub> -NH, $\alpha$ -CH	↑	↓	0.13 <sup>a</sup> 0.02 <sup>b</sup>
Sucrose	3.47, 3.56, 3.68, 3.76, 3.76, 3.76, 3.83, 3.83, 3.86, 3.89, 4.05, 4.22, 5.41	t, m, s, t, m, m, m, t, m, m, t, d, d	H4, H2, H1', H3, H6, H6', H6'', H3, H5, H5, H4, H3', H1	↓	↑	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$
Valine	0.97, 1.03, 2.28, 3.64	d, d, m, d	CH <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> , $\beta$ -CH, $\alpha$ -CH	↑	↓	$p < 0.01^a$ $p < 0.01^b$

\*Multiplicity indicates peaks quantity in  $^1\text{H}$ -NMR spectra (s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet). Were used 3 PCs that explained 95.75% of variation. The respective metabolites that presented statistical differences ( $p < 0.05$ ; t test) are indicated. The arrows indicate if metabolites are presented in lower (↓) or in higher (↑) proportion. The letters indicate paired t test between before and after in vitro (<sup>a</sup>) and in vivo (<sup>b</sup>) interaction.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, apesar do crescente interesse, a caracterização de metabólitos para doenças ainda é pequena se comparado aos estudos sobre marcadores, principalmente tratando-se da saliva (Yan, Apweiler *et al.*, 2009). A criação de métodos não invasivos que possibilitem o diagnóstico e a avaliação de tratamentos é considerada, atualmente, uma meta relevante para a manutenção do sistema de saúde em vários níveis (Takeda, Stretch *et al.*, 2009; Yan, Apweiler *et al.*, 2009). A idéia da utilização da saliva como matriz de análise para métodos diagnósticos existe há longo tempo e a criação de novas metodologias pode ser pertinente e viável, devido à facilidade da coleta do fluido e à quantidade de informações obtidas a partir dele (Silwood, Lynch *et al.*, 2002).

A saliva já foi estudada tanto por espectroscopia de massa para detecção de proteínas (Cabras, Castagnola *et al.*, 2008; Lillsunde, 2008) quanto pela Ressonância Magnética Nuclear (Dan, Kawano *et al.*, 1989; Antonyraj, Karunakaran *et al.*, 1998; Grootveld e Silwood, 2005; Walsh, Brennan *et al.*, 2006; Bertram, Eggers *et al.*, 2009). A Espectrometria por RMN é uma das técnicas mais completas para a investigação em nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, tanto de compostos puros como misturas complexas (Lindon, Holmes *et al.*, 2006).



Nos últimos anos a espectroscopia por RMN tem sido amplamente empregada na identificação de diferentes biofluidos e dentre suas vantagens, destaca-se a distinção em alta resolução dos sinais de cada molécula, sendo um método reprodutivo, uma técnica rápida e não-destrutiva, podendo, portanto, propiciar a utilização da amostra diversas vezes, desde que esta não sofra degradação (Brindle, Antti *et al.*, 2002; Silwood, Lynch *et al.*, 2002). Pode-se ainda associar a RMN 1-D, em uma dimensão, (Silwood, Lynch *et al.*, 2002) e 2-D, a RMN 2-D, em duas dimensões, (Durand, Fernandez *et al.*, 2008; Sato, Fukae *et al.*, 2008) para reprodução de resultados mais fiéis, removendo ambiguidades e sobreposição de sinais (Brindle, Antti *et al.*, 2002; Silwood, Lynch *et al.*, 2002). O estudo de degradação de metabólitos em função do tempo demonstrou haver pequena perda após a permanência da amostra em um período de 48 horas a 25°C, demonstrando que em experimentos bidimensionais, geralmente longos devido ao grande número de scans, há pouca degradação (Apêndice 3, página 95).

A presença de determinadas moléculas em determinado nível de concentração depende, em muitos casos, de sua produção e de seu transporte até a cavidade oral. Contudo, tanto o transporte quanto a produção podem ser comprometidos com alterações no metabolismo, tornando o monitoramento desses metabólitos potenciais biomarcadores para indicar não apenas desordens bucais, mas também sistêmicas (Chiappin, Antonelli *et al.*, 2007). No presente estudo, o perfil salivar de crianças saudáveis com ausência de doenças bucais apresentou poucas diferenças entre os metabólitos quando avaliado as diferentes dentições. Fato que já era esperado, visto que todos os indivíduos eram isentos de alterações sistêmicas.

A dentição decídua, ou seja, indivíduos mais jovens apresentou maior quantidade de Gamma-aminobutirato (GABA) e valina comparando-se a crianças de idade mais avançada. O GABA é um neurotransmissor, com função inibitória de sinapses, encontrado no sistema nervoso de diferentes espécies. Baixas concentrações plasmáticas de GABA podem gerar sintomas depressivos e ainda doença de Alzheimer e quadros de epilepsia (Rating, Siemes *et al.*, 1983; Fonteh, Harrington *et al.*, 2007). Já a valina é um aminoácido ditto essencial e sua deficiência está relacionada a alterações cerebrais e desordens musculares (Binek-Singer e Johnson, 1981; Fonteh, Harrington *et al.*, 2007).

Já a dentição permanente, ou seja, indivíduos mais próximos a adolescência, apresentou maior quantidade de etanol, 1,2-propanodiol e de propionato. Tais metabólitos podem ser resultantes do metabolismo de microorganismos (Scheie, Fejerskov *et al.*, 1998). Sugere-se que a dentição permanente possua maior superfície de contato devido ao maior número de elementos dentais e uma flora bacteriana mais complexa, desta forma, justificando-se a presença de dos metabólitos em maior quantidade nesta fase da dentição (Hannig e Hannig, 2009).

Em crianças com lesões cariosas, observou-se maior quantidade de lactato, n-butirato e n-caproato quando comparado ao grupo sem a presença de lesões cariosas. Os experimentos realizados para verificação dos metabólitos salivares em diferentes condições demonstraram redução dos metabólitos acetato (1,92ppm) e propionato (1,04 e 2,17ppm). Provavelmente oriundos do metabolismo de microorganismos, justificando sua maior presença em indivíduos com lesões cariosas. Entretanto a ornitina é um componente

endógenos e, portanto, pode ser um importante biomarcador do metabolismo para a cárie dental, entretanto essa possível relação deve ser mais explorada.

A sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico devido à sua utilização pelos *Streptococcus mutans* na formação de dextrana e mutana (Banas e Vickerman, 2003). Estas promovem a colonização bacteriana no esmalte, fator de extrema importância na formação da cárie, formando a película adquirida em conjunto com proteínas salivares, responsável pela fixação e seleção dos microorganismos (Gibbons e Van Houte, 1973). A síntese de dextrana e mutana resultam na formação de ácido láctico. Com a produção de ácido láctico há uma redução no pH da placa, o que faz com que a hidroxiapatita se fragmente transformando-se em fosfato tricálcico e em seguida em moléculas de fosfato monoácido de cálcio, ocorrendo a cárie dental (Ingram, 1990; Robinson, Shore *et al.*, 2000). No presente estudo, a sacarose foi encontrada em menor quantidade em indivíduos com lesões cariosas e a  $\alpha$ -glucose em maior quantidade, demonstrando uma intensa atividade microbiana, ao quebrar a sacarose para gerar energia (Banas e Vickerman, 2003).

Metabólitos exógenos também foram identificados tanto em amostras de saliva de indivíduos com cárie quanto em indivíduos sem cáries. Apesar dos voluntários terem sido instruídos a abster-se de atividades orais, foi identificado Lauril Sulfato de Sódio. Compostos fluoretados atuam melhor com agentes surfactantes, que auxiliam no processo de remineralização e na remoção física de microorganismos e químico na desorganização de lipídeos (Petersen, Assev *et al.*, 2006). O Lauril Sulfato de Sódio é o surfactante iônico mais comumente empregado na composição de pastas dentais (Rantanen, Jutila *et al.*, 2003).

Provavelmente, este composto foi encontrado em maior proporção em indivíduos com cárie devido à maior adsorção desse composto às irregularidades da superfície dental. Ademais, não se observou diferença deste composto entre as dentições, quando crianças sem lesões cariosas das diferentes dentições foram avaliadas.

A literatura relata que há distinção do perfil protéico de indivíduos sem a presença de cárie e com a presença de cárie (Bergandi, Defabianis *et al.*, 2007). Esta diferença pode ser explicada pela diferente atividade proteolítica entre esses indivíduos, quer seja pela diferença na expressão de proteases, inibidores de protease ou poliforfismo nos sítios proteolíticos de clivagem (Ayad, Van Wuyckhuysse *et al.*, 2000). O perfil salivar de indivíduos isentos de lesões cariosas diverge tanto no número de proteínas quanto na susceptibilidade destas a serem degradadas por proteases bacterianas, comparando-se com pacientes com lesões cariosas ativas (Cowman, Schaefer *et al.*, 1979). Sugere-se que essas diferenças também ocorram com metabólitos de baixo peso molecular, como os do presente estudo.

De acordo com Tomita *et al.* (Tomita, Miyake *et al.*, 2008), a concentração de lipídeos proveniente das glândulas parótidas foi maior em crianças suscetíveis, corroborando com o presente estudo, apesar de ser analisada saliva total. A variação de lipídeos pode estar associada ao desenvolvimento da cárie, uma vez que os lipídeos se ligam covalentemente às lesões cariosas e inibem a difusão dos ácidos bacterianos, potencializando sua ação local (Slomiany, Murty *et al.*, 1989) além de facilitar a adsorção de bactérias gram positivas, como o *Streptococcus mutans*, no substrato dental (Ciardi, Rolla *et al.*, 1977).

No estudo das etiologias das alterações da cavidade bucal, destacam-se a ingestão de bebidas e medicamentos. Alterações na composição salivar podem ser a resposta para microalterações dos tecidos dentais, devido às modificações bioquímicas no fluido salivar podendo propiciar o aumento do risco a cárie (Dale, Tao *et al.*, 2006). Neste contexto, cita-se os medicamentos que são utilizados cronicamente, especialmente em quadros de alergia respiratórias (Chipps e Harder, 2009; Ferrer, Morais-Almeida *et al.*, 2010).

Para tornar os medicamentos líquidos infantis mais agradáveis, sendo a sacarose é comumente incorporada às formulações químicas destes fármacos (Pierro, Abdelnur *et al.*, 2005). No presente estudo foi observada alteração da quantidade de açúcares tais como sacarose, glicose e galactose após a interação *in vitro* e *in vivo* com o anti-histamínico estudado. A literatura revela que após bochechos com solução de sacarose, há uma subsaturação de dihidrato fosfato dicálcio na saliva o que favorece o risco à cárie dental (Van Steijn, Amerongen *et al.*, 2002). Além disso, a sacarose é o carboidrato mais utilizado. Por esta razão, deve-se evitar a administração destes medicamentos sob a forma de xarope no período noturno, quando o fluxo salivar é reduzido, portanto sua capacidade de limpeza estará reduzida (Dawes, 2008). Ademais, ressalta-se a importância da higienização bucal após administração destes medicamentos (McDonald e Stookey, 1973; Sorvari, Meurman *et al.*, 1994).

Por outro lado, metabólitos tal qual o acetato, histidina,  $\gamma$ -aminobutirato, glutamato, isoleucina, propionato e valina apresentaram-se em menor quantidade após a interação medicamentosa, tanto no estudo *in vivo* como no *in vitro*. Somente a 4-hydroxiprolina apresentou-se em menor concentração apenas no estudo *in vivo*. Apesar do medicamento utilizado no presente

estudo possuir ácido cítrico para a estabilização do pH ácido, que atua como agente estimulante do fluxo salivar a redução da concentração dos metabólitos não se deve a diluição dos mesmos devido ao aumento do fluxo salivar (Pierro, Abdelnur *et al.*, 2005; Da Mata, Da Silva Marques *et al.*, 2009). Esta afirmação pôde ser comprovada no estudo *in vitro*, em que a interação medicamentosa foi realizada com amostra de saliva não estimulada. A redução da concentração do propionato é vantajosa, visto ser um ácido orgânico proveniente do metabolismo bacteriano, sendo um dos responsáveis pela dissolução da hidroxiapatita (Liu, Yue *et al.*, 1998). Entretanto, outros fatores devem ser considerados, como o fato de medicamentos possuírem baixo pH a alta acidez titulável, além dos níveis de sacarose apresentarem-se altos, caracterizando tais formulações como cariogênicas .

Diante da inexistência de trabalhos que avaliassem a interação medicamentosa com metabólitos salivares, optou-se por simular o que ocorre *in vivo* no modelo *in vitro*. Cabe ressaltar, que os resultados de estudos *in vitro* devem ser cautelosamente avaliados antes de sua extrapolação para a realidade clínica. Entretanto, o presente estudo demonstrou haver grande semelhança entre os resultados provenientes do ensaio *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que experimentos *in vitro* podem ser modelos interessantes para estudo da interação de medicamentos com componentes salivares.

## 6 CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada e das condições avaliadas, a Ressonância Magnética Nuclear em conjunto com a Análise dos Componentes Principais foi capaz de distinguir metabólitos salivares.

A partir das proposições e dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Houve diferenças entre os metabólitos salivares nas dentições decídua, mista e permanente de crianças saudáveis e isentas de lesões cáries;
- Houve diferença entre os metabólitos quando avaliada a saliva de crianças com e sem lesões cáries, sendo possível a separação destes grupos por meio do PCA;
- Tanto a interação *in vitro* quanto a *in vivo* de metabólitos salivares com o anti-histamínico sob a forma de xarope resultaram em alteração dos componentes salivares quando comparado ao momento anterior a interação

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R. J. e P. Loftus. In the proton and carbon-13 NMR spectroscopy - an integrative approach. John Wiley & Sons. 1978.

Antonyraj, K. J., T. Karunakaran, *et al.* Bactericidal activity and poly-L-proline II conformation of the tandem repeat sequence of human salivary mucin glycoprotein (MG2). Arch Biochem Biophys, v.356, n.2, Aug 15, p.197-206. 1998.

Atkinson, J. C., C. Yeh, *et al.* Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr, v.3, n.1, p.41-8. 1990.

Ayad, M., B. C. Van Wuyckhuysse, *et al.* The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. J Dent Res, v.79, n.4, Apr, p.976-82. 2000.

Banas, J. A. e M. M. Vickerman. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med, v.14, n.2, p.89-99. 2003.

Banderas-Tarabay, J. A., I. G. Zacarias-D'oleire, *et al.* Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. Arch Med Res, v.33, n.5, Sep-Oct, p.499-505. 2002.

Bergandi, L., P. Defabianis, *et al.* Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries. Eur J Oral Sci, v.115, n.2, Apr, p.93-6. 2007.

Bertram, H. C., N. Eggers, *et al.* Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. Anal Chem, v.81, n.21, Nov 1, p.9188-93. 2009.

Binek-Singer, P. e T. C. Johnson. The inhibition of brain protein synthesis following leucine or valine injection can be prevented. Biochem Biophys Res Commun, v.103, n.4, Dec 31, p.1209-15. 1981.

Brindle, J. T., H. Antti, *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabolomics. Nat Med, v.8, n.12, Dec, p.1439-44. 2002.

Cabras, T., M. Castagnola, *et al.* Carbachol-induced in vitro secretion of certain human submandibular proteins investigated by mass-spectrometry. Arch Oral Biol, Jul 8. 2008.

Chiappin, S., G. Antonelli, *et al.* Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clin Chim Acta, v.383, n.1-2, Aug, p.30-40. 2007.

Chipps, B. E. e J. M. Harder. Antihistamine treatment for allergic rhinitis: different routes, different outcomes? Allergy Asthma Proc, v.30, n.6, Nov-Dec, p.589-94. 2009.



Ciardi, J. E., G. Rolla, *et al.* Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. Scand J Dent Res, v.85, n.6, Sep, p.387-91. 1977.

Coogan, M. M. e S. J. Challacombe. Serum and salivary antibodies to a mycobacterial 65-kDa stress protein are elevated in HIV-positive patients and modified by oral candidiasis. Oral Microbiol Immunol, v.15, n.5, Oct, p.284-9. 2000.

Cowman, R. A., S. J. Schaefer, *et al.* Differential utilization of proteins in saliva from caries-active and caries-free subjects as growth substrates by plaque-forming streptococci. J Dent Res, v.58, n.10, Oct, p.2019-27. 1979.

Cury, J. A., M. A. Rebelo, *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res, v.34, n.6, Nov-Dec, p.491-7. 2000.

Da Mata, A. D., D. N. Da Silva Marques, *et al.* Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow: a randomized controlled trial. Oral Dis, v.15, n.3, Apr, p.220-8. 2009.

Dale, B. A., R. Tao, *et al.* Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. BMC Oral Health, v.6 Suppl 1, p.S13. 2006.

Dan, K., K. Kawano, *et al.* High resolution proton nuclear magnetic resonance studies of human saliva. Shika Kiso Igakkai Zasshi, v.31, n.3, Jun, p.324-8. 1989.

Dawes, C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. J Am Dent Assoc, v.139 Suppl, May, p.18S-24S. 2008.

Delaleu, N., H. Immervoll, *et al.* Biomarker profiles in serum and saliva of experimental Sjogren's syndrome: associations with specific autoimmune manifestations. Arthritis Res Ther, v.10, n.1, p.R22. 2008.

Durand, J., F. Fernandez, *et al.* DOSY technique applied to palladium nanoparticles in ionic liquids. Magn Reson Chem, v.46, n.8, Aug, p.739-43. 2008.

Elad, S., S. Heisler, *et al.* Saliva secretion in patients with allergic rhinitis. Int Arch Allergy Immunol, v.141, n.3, p.276-80. 2006.

Emekli-Alturfan, E., G. Demir, *et al.* Altered biochemical parameters in the saliva of patients with breast cancer. Tohoku J Exp Med, v.214, n.2, Feb, p.89-96. 2008.

Ferrer, M., M. Morais-Almeida, *et al.* Evaluation of treatment satisfaction in children with allergic disease treated with an antihistamine: an international, non-interventional, retrospective study. Clin Drug Investig, v.30, n.1, p.15-34. 2010.

Fonteh, A. N., R. J. Harrington, *et al.* Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. Amino Acids, v.32, n.2, Feb, p.213-24. 2007.

Gibbons, R. J. e J. Van Houte. On the formation of dental plaques. J Periodontol, v.44, n.6, Jun, p.347-60. 1973.

Gil, V. M. S. e C. F. G. C. Geraldês. Ressonância magnética nuclear, fundamentos, métodos e aplicações. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 1987.

- Giusti, L., L. Bazzichi, *et al.* Specific proteins identified in whole saliva from patients with diffuse systemic sclerosis. J Rheumatol, v.34, n.10, Oct, p.2063-9. 2007.
- Grootveld, M. e C. J. Silwood. 1H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. Biochem Biophys Res Commun, v.329, n.1, Apr 1, p.1-5. 2005.
- Hannig, C. e M. Hannig. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. Clin Oral Investig, v.13, n.2, Jun, p.123-39. 2009.
- Hardt, M., L. R. Thomas, *et al.* Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. Biochemistry, v.44, n.8, Mar 1, p.2885-99. 2005.
- Hay, D. I. Salivary factors in caries models. Adv Dent Res, v.9, n.3, Nov, p.239-43. 1995.
- Ingram, G. S. Chemical events during tooth dissolution. J Dent Res, v.69 Spec No, Feb, p.581-6; discussion 634-6. 1990.
- Katakura, A., I. Kamiyama, *et al.* Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects. Bull Tokyo Dent Coll, v.48, n.4, Nov, p.199-203. 2007.
- Lambert, M. A. e C. W. Moss. Gas-liquid chromatography of short-chain fatty acids on Dextsil 300 GC. J Chromatogr, v.74, n.2, Dec 20, p.335-8. 1972.
- Levy, M. L., D. Price, *et al.* Inadequacies in UK primary care allergy services: national survey of current provisions and perceptions of need. Clin Exp Allergy, v.34, n.4, Apr, p.518-9. 2004.
- Lillsunde, P. Analytical techniques for drug detection in oral fluid. Ther Drug Monit, v.30, n.2, Apr, p.181-7. 2008.
- Lin, A. L., D. A. Johnson, *et al.* Alteration in salivary function in early HIV infection. J Dent Res, v.82, n.9, Sep, p.719-24. 2003.
- Lindon, J. C., E. Holmes, *et al.* Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. Pharm Res, v.23, n.6, Jun, p.1075-88. 2006.
- Linke, H. A. e S. J. Moss. Quantitation of carbohydrate sweeteners and organic acids in human oral fluid using HPLC analysis. Z Ernährungswiss, v.31, n.2, Jun, p.147-54. 1992.
- Liu, L., S. Yue, *et al.* [Comparison of demineralization of different organic acid to enamel]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, v.16, n.2, May, p.103-4, 113. 1998.
- Maguire, A., W. Baqir, *et al.* Are sugars-free medicines more erosive than sugars-containing medicines? An in vitro study of paediatric medicines with prolonged oral clearance used regularly and long-term by children. Int J Paediatr Dent, v.17, n.4, Jul, p.231-8. 2007.

- Maguire, A. e A. J. Rugg-Gunn. Medicines in liquid and syrup form used long-term in paediatrics: a survey in the Northern Region of England. Int J Paediatr Dent, v.4, n.2, Jun, p.93-9. 1994.
- Mcdonald, J. L., Jr. e G. K. Stookey. Laboratory studies concerning the effect of acid-containing beverages on enamel dissolution and experimental dental caries. J Dent Res, v.52, n.2, Mar-Apr, p.211-6. 1973.
- Nagler, R., G. Bahar, *et al.* Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer. Clin Cancer Res, v.12, n.13, Jul 1, p.3979-84. 2006.
- Nair, P. N. e H. E. Schroeder. Duct-associated lymphoid tissue (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. Immunology, v.57, n.2, Feb, p.171-80. 1986.
- Nieuw Amerongen, A. V., C. H. Oderkerk, *et al.* Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. Caries Res, v.21, n.4, p.297-309. 1987.
- Petersen, F. C., S. Assev, *et al.* Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells. Arch Oral Biol, v.51, n.8, Aug, p.665-71. 2006.
- Pierro, V. S., J. P. Abdelnur, *et al.* Free sugar concentration and pH of paediatric medicines in Brazil. Community Dent Health, v.22, n.3, Sep, p.180-3. 2005.
- Rantanen, I., K. Jutila, *et al.* The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo. Swed Dent J, v.27, n.1, p.31-4. 2003.
- Rating, D., H. Siemes, *et al.* Low CSF GABA concentration in children with febrile convulsions, untreated epilepsy, and meningitis. J Neurol, v.230, n.4, p.217-25. 1983.
- Robinson, C., R. C. Shore, *et al.* The chemistry of enamel caries. Crit Rev Oral Biol Med, v.11, n.4, p.481-95. 2000.
- Rochfort, S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. J Nat Prod, v.68, n.12, Dec, p.1813-20. 2005.
- Sanders, J. K. M. e B. K. Hunter. Modern NMR spectroscopy - A guide for chemists. Oxford University Press, Oxford. 1994.
- Sato, H., K. Fukae, *et al.* 2D Selective-TOCSY-DQFCOSY and HSQC-TOCSY NMR experiments for assignment of a homogeneous asparagine-linked triantennary complex type undecasaccharide. Carbohydr Res, v.343, n.8, Jun 9, p.1333-45. 2008.
- Scheie, A. A., O. Fejerskov, *et al.* The effects of xylitol-containing chewing gums on dental plaque and acidogenic potential. J Dent Res, v.77, n.7, Jul, p.1547-52. 1998.
- Schupbach, P., F. G. Oppenheim, *et al.* Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. Eur J Oral Sci, v.109, n.1, Feb, p.60-8. 2001.
- Shaw, L. e H. D. Glenwright. The role of medications in dental caries formation: need for sugar-free medication for children. Pediatrician, v.16, n.3-4, p.153-5. 1989.

Shpitzer, T., G. Bahar, *et al.* A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. J Cancer Res Clin Oncol, v.133, n.9, Sep, p.613-7. 2007.

Silwood, C. J., E. Lynch, *et al.*  $^1\text{H}$  and  $(^{13}\text{C})$  NMR spectroscopic analysis of human saliva. J Dent Res, v.81, n.6, Jun, p.422-7. 2002.

Slomiany, B. L., V. L. Murty, *et al.* Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility. Arch Oral Biol, v.34, n.4, p.229-37. 1989.

Sorvari, R., J. H. Meurman, *et al.* Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. Caries Res, v.28, n.4, p.227-32. 1994.

Takeda, I., C. Stretch, *et al.* Understanding the human salivary metabolome. NMR Biomed, v.22, n.6, Jul, p.577-84. 2009.

Tan, W., L. Sabet, *et al.* Optical protein sensor for detecting cancer markers in saliva. Biosens Bioelectron, Apr 6. 2008.

Tenuta, L. M., A. A. Del Bel Cury, *et al.* Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. J Dent Res, v.85, n.9, Sep, p.834-8. 2006.

Thomson, W. M., A. J. Spencer, *et al.* Is medication a risk factor for dental caries among older people? Community Dent Oral Epidemiol, v.30, n.3, Jun, p.224-32. 2002.

Tomita, Y., N. Miyake, *et al.* Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience. J Oleo Sci, v.57, n.2, p.115-21. 2008.

Troxler, R. F., G. D. Offner, *et al.* Structural relationship between human salivary histatins. J Dent Res, v.69, n.1, Jan, p.2-6. 1990.

Van Nieuw Amerongen, A., J. G. Bolscher, *et al.* Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res, v.38, n.3, May-Jun, p.247-53. 2004.

Van Steijn, G. J., A. V. Amerongen, *et al.* Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. J Periodontal Res, v.37, n.4, Aug, p.245-9. 2002.

Vratsanos, S. M. e I. D. Mandel. Comparative plaque acidogenesis of caries-resistant vs. caries-susceptible adults. J Dent Res, v.61, n.3, Mar, p.465-8. 1982.

Walsh, M. C., L. Brennan, *et al.* Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. Am J Clin Nutr, v.84, n.3, Sep, p.531-9. 2006.

Wickstrom, C. e G. Svensater. Salivary gel-forming mucin MUC5B--a nutrient for dental plaque bacteria. Oral Microbiol Immunol, v.23, n.3, Jun, p.177-82. 2008.

Wong, D. T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. J Am Dent Assoc, v.137, n.3, Mar, p.313-21. 2006.

Xu, G. W., X. Lu, *et al.* [Recent advances in metabonomics]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, v.29, n.6, Dec, p.701-11. 2007.

Yan, W., R. Apweiler, *et al.* Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. Proteomics Clin Appl, v.3, n.1, Jan 1, p.116-134. 2009.

Yao, Y., E. A. Berg, *et al.* Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. J Biol Chem, v.278, n.7, Feb 14, p.5300-8. 2003.

Yoon, M. S., V. Jankowski, *et al.* Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. Biochem Biophys Res Commun, v.323, n.2, Oct 15, p.377-81. 2004.

## 6 ANEXOS

### ANEXO 1



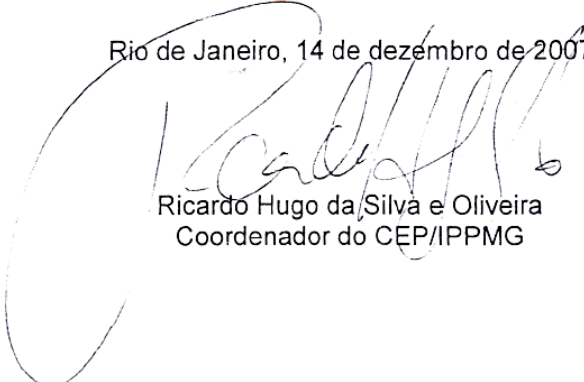
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO  
UFRJ

INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### MEMORANDO DE APROVAÇÃO

O projeto "Análise da saliva total de crianças de 5-12 anos de idade através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear", de número 23/07-CER/IPPMG, de responsabilidade da Dra. Raquel dos Santos Pinheiro, foi analisado por este Comitê e aprovado nesta data.

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2007



Ricardo Hugo da Silva e Oliveira  
Coordenador do CEP/IPPMG

**ANEXO 2**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA  
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

Será realizado um estudo na Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, com o objetivo de analisar a saliva de seu filho através de Ressonância Nuclear Magnética. Nesta pesquisa será pedido ao seu filho(a) que cuspa em um “potinho de plástico”, o que não causará nenhum desconforto a ele(a).

Sua participação é voluntária e, caso não queira participar, sua recusa não causará nenhum prejuízo ao tratamento odontológico da criança nesta instituição. O pesquisador responsável (Raquel dos Santos Pinheiro) poderá ser acessado para esclarecimento de eventuais dúvidas, a qualquer momento, pelos telefones 2562-2100 ou 2562-2098. O responsável poderá solicitar a saída do paciente deste estudo em qualquer momento, assim como a própria criança e, neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas. Os dados individuais dos participantes serão mantidos sob sigilo, sendo manipulados apenas pelos responsáveis pela pesquisa e arquivados por um período de 5 anos. Entretanto os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada, estando também disponíveis para consulta na Biblioteca da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ localizada no anexo da Disciplina no 3º andar do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho ou na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ).

Atenciosamente,

Eu, \_\_\_\_\_, identidade n.º \_\_\_\_\_, certifico que lendo as informações acima concordo com o que foi exposto, e autorizo a utilização dos resultados do meu filho(a) \_\_\_\_\_ para o presente estudo.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura Testemunha (1)

\_\_\_\_\_  
Assinatura Testemunha(2)

## ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ESTUDOS DE SAÚDE COLETIVA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER Nº130/2009**  
**PROCESSO Nº66/2009**

**Projeto de Pesquisa: Análise IN Vitro dos metabólicos salivares de crianças com lesões cariosas.**

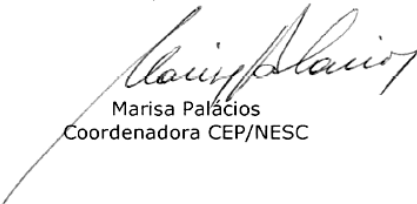
**Pesquisador: Tatiana Kelly da Silva Fidalgo**

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolve APROVAR o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimento ou orientação que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 03 de dezembro de 2009.

  
Marisa Palácios  
Coordenadora CEP/NESC



**ANEXO 4**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA  
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

Será realizado um estudo na Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, com o objetivo de analisar a saliva de seu filho através de Ressonância Nuclear Magnética e por eletroforese. Nesta pesquisa será pedido ao seu filho(a) que cuspa em um “potinho de plástico”, e será realizado exame clínico bucal, o que não causará nenhum desconforto a ele (a).

Sua participação é voluntária e, caso não queira participar, sua recusa não causará nenhum prejuízo ao tratamento odontológico da criança nesta instituição. O pesquisador responsável (Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza) poderá ser acessado para esclarecimento de eventuais dúvidas, a qualquer momento, pelos telefones (21) 2562-2101, ramal 6. O responsável poderá solicitar a saída do paciente deste estudo em qualquer momento, assim como a própria criança e, neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas. Os dados individuais dos participantes serão mantidos sob sigilo, sendo manipulados apenas pelos responsáveis pela pesquisa e arquivados por um período de 5 anos. Entretanto os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada, estando também disponíveis para consulta na Biblioteca da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ localizada no anexo da Disciplina no 3º andar do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho ou na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ). Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva pelo telefone (21) 2598-9293 ou pelo e-mail cep@nesc.ufrj.br.

Atenciosamente,

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
Professora Titular da Disciplina de Odontopediatria – FO/UFRJ  
Professora Orientadora da pesquisa

Eu, \_\_\_\_\_, identidade n.º \_\_\_\_\_,  
responsável pelo menor \_\_\_\_\_, certifico  
que lendo as informações acima concordo com o que foi exposto, e autorizo a doação da saliva  
para este estudo. Nome

RJ, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

---

Assinatura do responsável

### FICHA DE EXAME EPIDEMIOLÓGICO DE CÁRIE DENTÁRIA

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos Sexo: \_\_\_\_\_

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Diagnóstico																
Diagnóstico																
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

C	E	Ei	O	CPOD	NE	HIG	c	e	ei	o	ceo	hig	TOTAL

- **CONDIÇÃO DENTAL PERMANENTE:** O=Hígido; 1=Cariado; 2=Restaurado com cárie; 3=Restaurado sem cárie; 4=Perdido por cárie; 5=Perdido por outras razões; 6=Selante; 7= Apoio de ponte ou coroa; 8=Não erupcionado; 9=Dente excluído; T=Trauma(fratura).
- 
- **CONDIÇÃO DENTAL DECÍDUO:** A=Hígido; B=Cariado; C=Restaurado com cárie; D=Restaurado sem cárie; E=Perdido por cárie; F=Perdido por outras razões; G=Selante; H= Apoio de ponte ou coroa; K=Não erupcionado; L=Dente excluído; T=Trauma(fratura).

## ANEXO 5



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ESTUDOS DE SAÚDE COLETIVA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER Nº 64 /2009**  
**PROCESSO Nº42/2008**

**Projeto de Pesquisa: Análise IN vitro da influencia da sacarose e de medicamentos sobre metabólicos salivares.**

**Pesquisador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolve APROVAR o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimento ou orientação que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 08 de abril de 2009.

  
Marisa Palácios  
Coordenadora CEP/NESC

## ANEXO 6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ESTUDOS DE SAÚDE COLETIVA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER Nº 65 /2009**  
**PROCESSO Nº43/2008**

**Projeto de Pesquisa: Influencia da sacarose e de medicamentos sobre metabólicos salivares estudo IN vivo.**

**Pesquisador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolve **APROVAR** o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimento ou orientação que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 08 de abril de 2009.

Marisa Palácios  
Coordenadora CEP/NESC

**ANEXO 7**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA  
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

Será realizado um estudo na Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, com o objetivo de analisar a saliva de seu filho através de Ressonância Nuclear Magnética e por eletroforese de proteínas antes e após a mistura *in vitro* com a sacarose, Dimetapp® e Claritin®. Nesta pesquisa será pedido ao seu filho(a) que cuspa em um “potinho de plástico”, o que não causará nenhum desconforto a ela.

Sua participação é voluntária e, caso não queira participar, sua recusa não causará nenhum prejuízo ao tratamento odontológico da criança nesta instituição. O pesquisador responsável (Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza) poderá ser acessado para esclarecimento de eventuais dúvidas, a qualquer momento, pelos telefones (21) 2562-2101, ramal 6. O responsável poderá solicitar a saída do paciente deste estudo em qualquer momento, assim como a própria criança e, neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas. Os dados individuais dos participantes serão mantidos sob sigilo, sendo manipulados apenas pelos responsáveis pela pesquisa e arquivados por um período de 5 anos. Entretanto os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada, estando também disponíveis para consulta na Biblioteca da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ localizada no anexo da Disciplina no 3º andar do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho ou na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ). Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva pelo telefone (21) 2598-9293 ou pelo e-mail cep@nesc.ufrj.br.

Atenciosamente,

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
Professora Titular da Disciplina de Odontopediatria – FO/UFRJ  
Professora Orientadora da pesquisa

Eu, \_\_\_\_\_, identidade n.º \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_, certifico que lendo as informações acima concordo com o que foi exposto, e autorizo a doação da saliva para este estudo.

RJ, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

---

Assinatura do responsável

**ANEXO 8**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA  
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

Será realizado um estudo na Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, com o objetivo de analisar a saliva do voluntário por meio de Ressonância Nuclear Magnética e por eletroforese de proteínas antes e após antes bochecho com sacarose, Claritin<sup>®</sup> e Dimetapp<sup>®</sup>, sendo mínimo os riscos de ocorrer alergia, visto que trata-se de um anti-alérgico e antitussígeno. Nesta pesquisa o voluntário deverá cuspir em um “potinho de plástico”, o que não causará nenhum desconforto.

Sua participação é voluntária e, caso não queira participar, sua recusa não causará nenhum prejuízo ao tratamento odontológico da criança nesta instituição. O pesquisador responsável (Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza) poderá ser acessado para esclarecimento de eventuais dúvidas, a qualquer momento, pelos telefones 2562-2101 ou 2562-2098. O participante poderá solicitar a saída do deste estudo em qualquer momento e, neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas. Os dados individuais dos participantes serão mantidos sob sigilo, sendo manipulados apenas pelos responsáveis pela pesquisa e arquivados por um período de 5 anos. Entretanto os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada, estando também disponíveis para consulta na Biblioteca da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ localizada no anexo da Disciplina no 3º andar do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho ou na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ). Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva pelo telefone 21 2598-9293 ou pelo e-mail cep@iesc.ufrj.br.

Atenciosamente,

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
Professora Titular da Disciplina de Odontopediatria – FO/UFRJ  
Professora Orientadora da pesquisa

Eu, \_\_\_\_\_, identidade n.º \_\_\_\_\_,  
lendo as informações acima concordo com o que foi exposto, e faço a doação da saliva para este estudo.

RJ, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

---

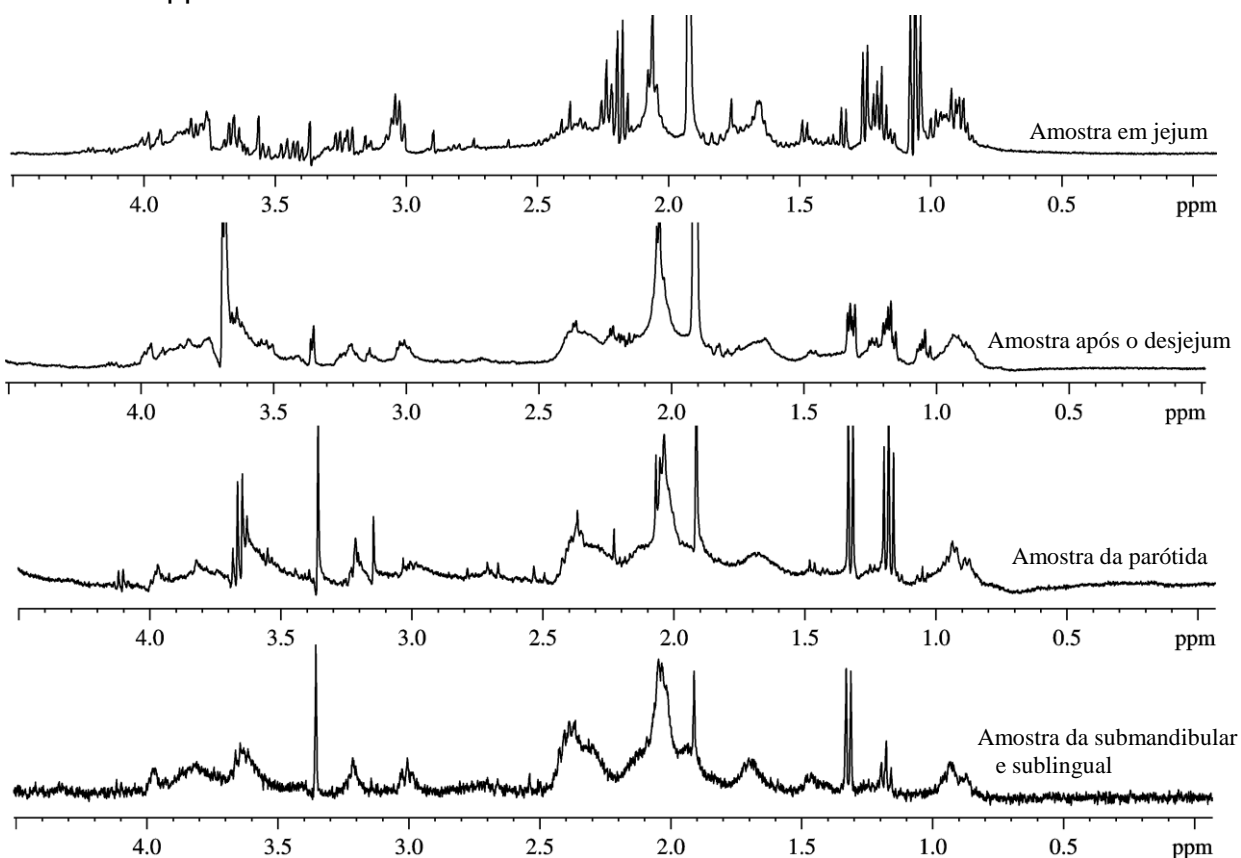
Assinatura do responsável

## 9. APÊNDICE

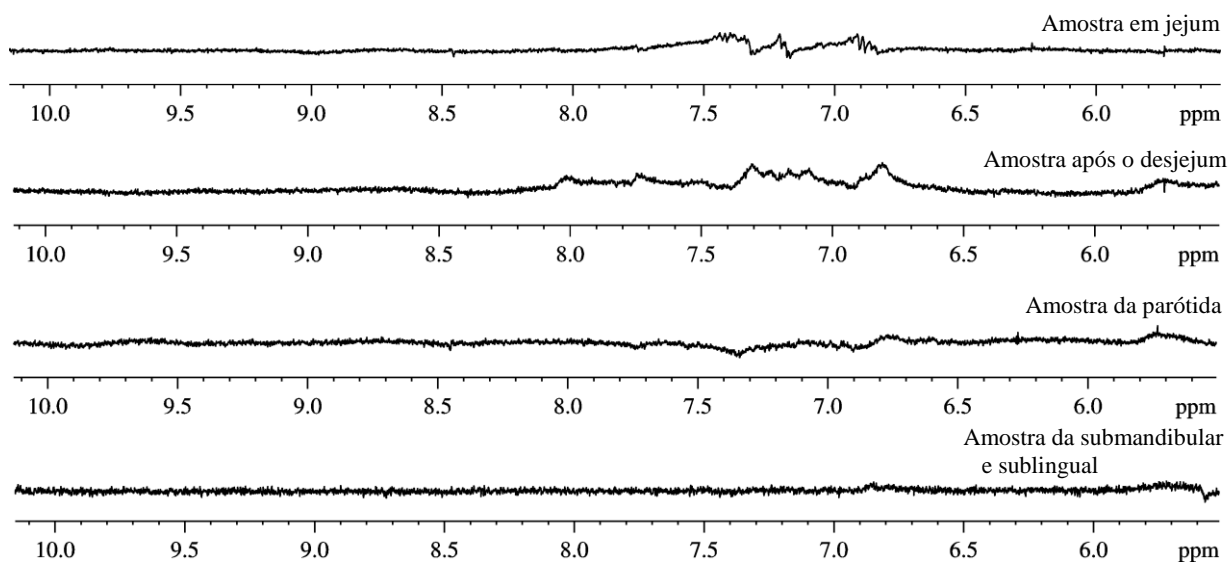
### APÊNDICE 1

Análise da saliva em diferentes condições: coleta do voluntário em jejum, após o desjejum, da glândula parótida e das glândulas sublingual e submandibular.

- 0 a 4.5ppm:



- 5.5 a 10ppm:





## APÊNDICE 2

Avaliação da interação protéica *in vitro* com o anti-histamínico sob a forma de xarope (Claritin®; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil).

Amostras	Antes (Abs)	Depois (Abs)	Antes - Depois (Abs)
1	0,339	1,207	0,342
2	0,308	1,261	0,396
3	0,163	1,092	0,227
4	0,244	2,710	1,845
5	0,356	1,505	0,640
6	0,157	1,219	0,354
7	0,325	2,476	1,611
8	0,262	1,613	0,748
9	0,296	1,315	0,408
10	0,278	1,292	1,014
<b>Média (±DP)</b>	0,2728 (±0,07)	1,569 (±0,56)	0,759 (±0,56)

$\lambda = 214\text{nm}$  (leitura relativa a ligação peptídica);

Abs do medicamento = 0,865.  $P=0,02$  (Teste *t* pareado,  $p<0,05$ );

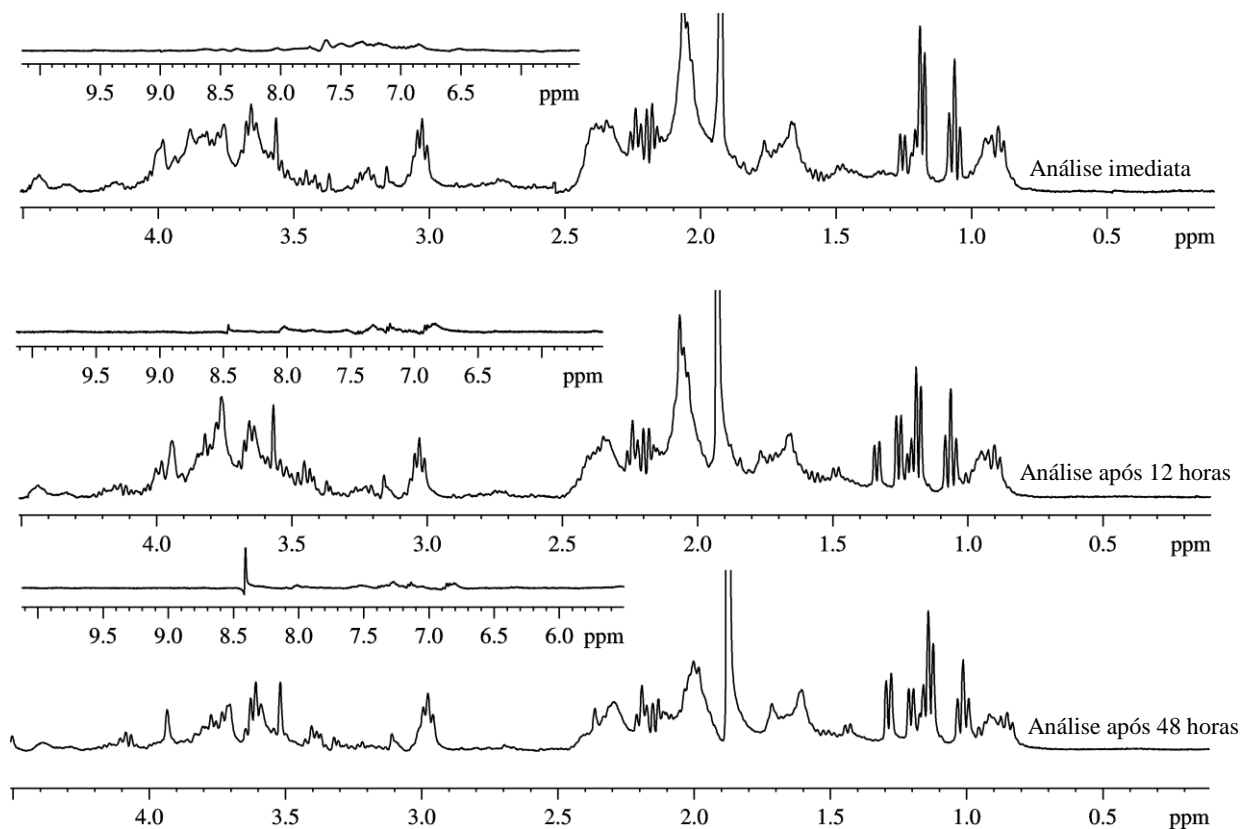
Avaliação as Abs do medicamento: 10 $\mu\text{l}$  de medicamento + 990 $\mu\text{l}$  de água;

Avaliação as Abs da saliva (Antes): 10 $\mu\text{l}$  de saliva + 990 $\mu\text{l}$  de água;

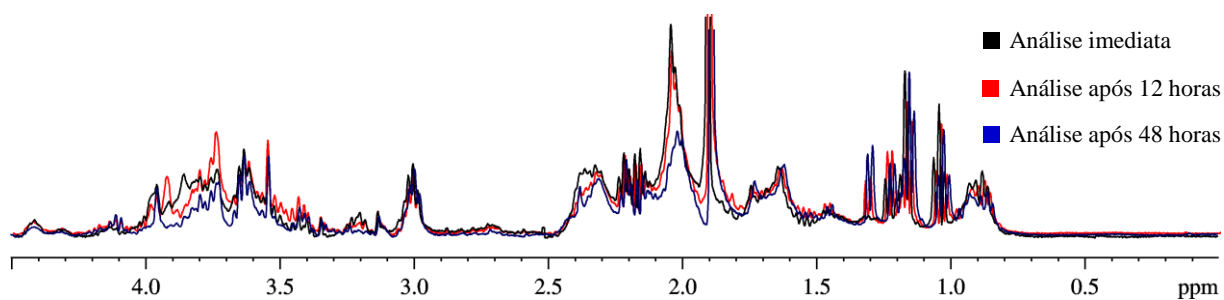
Avaliação as Abs após a interação (Depois): 10 $\mu\text{l}$  de medicamento + 10 $\mu\text{l}$  de saliva + 990 $\mu\text{l}$  de água.

### APÊNDICE 3

Detalhe dos espectros (0 a 10ppm) de uma amostra de saliva ao longo do tempo. Os espectros foram extraídos de uma amostra imediatamente após descongelada, após 12 horas a 25°C e após 48 horas a 25°C.



Sobreposição dos espectros de análise da degradação da amostra da região de 0 a 5ppm ampliada.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)