



## **COMPARAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DA SALIVA ESTIMULADA E NÃO ESTIMULADA**

**Maria de Fátima Viera Alves<sup>1</sup>, Maria Angélica Sátyro Gomes Alves<sup>2</sup>**

### **RESUMO**

A saliva apresenta proporções de biomoléculas semelhantes ao sangue, deste modo, pode funcionar como meio de diagnóstico para diversas doenças. Dentre as vantagens podemos enfatizar a facilidade na coleta, ser menos invasivo e indolor. A coleta da saliva pode ser realizada de forma estimulada ou não estimulada. A estimulação afeta a quantidade e a constituição da saliva. Dentre os parâmetros que podem sofrer alterações, destacam-se os constituintes oxidantes e antioxidantes. No entanto, não há uniformidade no método de coleta de saliva para este tipo de análise. Como o estresse oxidativo apresenta uma associação clássica com o desenvolvimento de diversas alterações sistêmicas e bucais, o presente estudo visa avaliar as alterações nos sistemas antioxidantes em duas técnicas de sialometria, sendo estas estimulada e não estimulada. O seu desenvolvimento será importante para caracterizar o fluido obtido por diferentes métodos de coleta de forma a padronizar experimentos futuros na área. Foram coletadas amostras de saliva estimulada e não estimulada de acadêmicos de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande com idade entre 18 e 29 anos de ambos os gêneros. As amostras foram centrifugadas para realizar a sialometria e congeladas para em seguida serem submetidas às análises pra quantificação da atividade antioxidante do ácido úrico e atividade quelante do íon ferroso. Os resultados demonstraram que a saliva não estimulada apresentou valores significativamente mais altos tanto de atividade quelante íon ferroso como na concentração de ácido úrico em relação à saliva estimulada. Levando a concluir que a diferenças na atividade antioxidante de acordo com o tipo de coleta, sendo parâmetros avaliados maiores na saliva não estimulada.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, diagnóstico, sialometria

---

<sup>1</sup>Graduando em Odontologia, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG, Patos, PB, maria.v.alves1@hotmail.com.

<sup>2</sup>Doutora, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG, Patos, PB, angelicasatyro@hotmail.com

## **ABSTRACT**

### ***COMPARASION BETWEEN ANTIOXIDANTE ACTIVIES OF STIMULATED AND NON-STIMULATED SALIVA***

Saliva has proportions of biomolecules similar to blood, so it can function as a diagnostic medium for various diseases. Among the advantages we can emphasize the ease of collection, being less invasive and painless. The collection of saliva can be performed stimulated or non-stimulated. Stimulation affects the amount and constitution of saliva. Among the parameters that can be changed are the following constituent oxidants and antioxidants. However, there is no uniformity in the method of collecting saliva for this type of analysis. As oxidative stress presents a classic association with the development of several systemic and oral alterations, the present study aims to evaluate the alterations in the antioxidant systems in two techniques of sialometry, being these stimulated and not stimulated. Its development will be important to characterize the fluid obtained by different collection methods in order to standardize future experiments in the area. Samples of stimulated and unstimulated saliva were collected from dental students of the Federal University of Campina Grande, aged between 18 and 29 years old, of both genders. The samples were centrifuged to perform the sialometry and frozen and then subjected to the analyzes for the quantification of the antioxidant activity of uric acid and chelating activity of the ferrous ion. The results showed that the non-stimulated saliva showed significantly higher values of both the ionic iron chelating activity and the uric acid concentration in relation to the stimulated saliva. Leading to conclude that the differences in antioxidant activity according to the type of collection, being parameters evaluated higher in unstimulated saliva.

**Keywords:** Oxidative stress, diagnosis, sialometry.

## INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido heterogêneo composto pela mistura das secreções das glândulas salivares maiores e menores e do fluido crevicular gengival, tendo em sua composição glicoproteínas, eletrólitos, pequenas moléculas orgânicas e substâncias transportadas do sangue, banhando constantemente os dentes e a mucosa oral (BATTINO et al., 2002).

Relatos da literatura de estudos sialoquímicos demonstram que a saliva apresenta proporções de biomoléculas semelhantes ao sangue. Devido a essa semelhança, a mesma vem sendo amplamente estudada como meio de diagnóstico de doenças orais e sistêmicas visando acrescentar uma nova possibilidade de exame complementar. A análise da saliva tem por objetivos auxiliar no diagnóstico de doenças assim como avaliar a progressão desta. A sialometria é um método de fácil execução e não invasivo, não oferecendo riscos ao paciente (MOURA et al., 2007; MUSSAVIRA; DHARMALINGAM; SUKUMARAN, 2015).

Este fluido exerce várias funções protetoras como limpeza, tamponamento, lubrificação das superfícies bucais, ação antibacteriana, antifúngica, manutenção da supersaturação da hidroxiapatita, participação na formação da película adquirida do esmalte, efeito enxaguatório, dentre outros (FEJERSKOV O; KIDD E, 2011). Em adição a essas e outras propriedades protetoras, a saliva constitui a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que os processos de mastigação e digestão promovem uma variedade de reações como por exemplo a peroxidação lipídica (BATTINO et al., 2002). A saliva apresenta diferentes fatores antioxidantes como por exemplo ácido úrico, ácido ascórbico, glutathione e albumina (MOORE et al., 1994).

A coleta da saliva pode ser realizada em uma glândula isolada ou pode-se coletar a saliva total. Esta última pode ser feita de forma estimulada ou não estimulada. Pode-se optar por diferentes tipos de estimulação, como mecânica (com goma de mascar ou látex) ou química (utilizando ácido cítrico (MOURA et al., 2007; NAVAZESH, 1993). Dentre os parâmetros que podem sofrer alteração, destacam-se os constituintes oxidantes e antioxidantes (BATTINO et al., 2002).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante nas células e tecidos, resultando na superprodução de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (RANI et al., 2016). Sistemas biológicos com ação antioxidante incluem complexos não

enzimáticos como glutatona reduzida, vitaminas A, C e E e ácido úrico, e enzimáticos, como catalase, superóxido dismutase (SOD), e várias outras peroxidases (LAVIE, 2003; MUSSAVIRA; DHARMALINGAM; SUKUMARAN, 2015). O estresse oxidativo constitui ainda um fator de risco para o desenvolvimento de várias patologias, como desenvolvimento de tumores, diabetes e complicações cardiovasculares (RANI et al., 2016). Além disso pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de patologias orais inflamatórias como ocorre na doença periodontal causando danos irreversíveis as estruturas de suporte dentário. (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003). Devido a isso temos por objetivo investigar a presença de alterações na capacidade antioxidante da saliva obtida por métodos de fluxo estimulado e não estimulado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo é do tipo quantitativo, transversal e experimental. A pesquisa foi realizada na cidade de Patos, localizada no estado da Paraíba, na mesorregião do Sertão Paraibano, a qual possui área territorial de 515,74 km<sup>2</sup> e população composta por 100.674 habitantes, de acordo com os dados da última contagem populacional (BRASIL, 2010). A mesma foi desenvolvida no período de agosto de 2016 a abril de 2017.

O grupo estudado foi composto por 42 acadêmicos de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, sendo coletadas amostras de saliva estimulada e não estimulada. Todos tinham entre 18 e 29 anos de ambos os gêneros e não fumantes. Os participantes do estudo foram orientados a não utilizarem medicamentos ou consumirem álcool no dia que antecede a coleta.

Foi preenchido um termo de consentimento livre e esclarecido e também um questionário com as informações dos pacientes, como gênero, idade, doenças pré e coexistentes, uso de medicamentos, dentre outros, além disso foram explicados os procedimentos que iriam ser realizados e o objetivo dos mesmos.

Este estudo foi submetido ao sistema eletrônico Plataforma Brasil para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos sendo aprovado com o número 57114616.2.0000.5182.

### **Coleta da Saliva**

A sialometria foi feita pelo método de Navazesh modificado (“spitting”). Para a coleta da saliva estimulada, foram utilizados anéis de látex medindo 5mm, amarrados a um fio dental para garantir segurança ao paciente, estando estes materiais devidamente esterilizados. O indivíduo permaneceu sentado com a cabeça levemente inclinada para baixo, deixando acumular a saliva no soalho bucal enquanto mastigava o anel de látex. O mesmo foi orientado a expelir a amostra em copos descartáveis a cada sessenta segundos, durante um período de 6 minutos, sendo a amostra excretada no primeiro minuto desprezada. Para a coleta da saliva não estimulada, o estudante permaneceu sentado com a cabeça levemente inclinada para baixo, deixando acumular a saliva no soalho bucal. O mesmo foi orientado a expelir a amostra em copos descartáveis a cada sessenta segundos, durante um período de 6 minutos, sendo a amostra excretada no primeiro minuto desprezada. As amostras foram centrifugadas durante 5 min em 2500 rotações por minuto (r.p.m.) para separar a espuma que foi desprezada e em seguida foi feita a medida do volume salivar utilizando seringas descartáveis estéreis, (NAVAZESH, 1993). O material coletado foi congelado, pra posteriormente, serem realizadas as análises salivares.

### **Medida do Ácido Úrico Salivar**

O ácido úrico funciona como um importante agente antioxidante não enzimático (MOORE et al., 1994; MUSSAVIRA; DHARMALINGAM; SUKUMARAN, 2015). Foi realizada a medida da concentração deste na saliva pelo método colorimétrico uricase/4-aminoantipirina. Neste protocolo, o ácido úrico é convertido pela enzima uricase, em alantoína e peróxido de hidrogênio, o qual sob influência catalítica da peroxidase reage com DHBS (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato) e 4-aminoantipirina formando o cromógeno antipirilquinonimina, de coloração vermelha, que absorve a luz em 520 nm. Para o ensaio, foi utilizado o kit para ácido úrico liquiform (Labtest<sup>®</sup> Qualitrol) e a concentração de ácido úrico em cada amostra foi expressa em mg/dl. O equipamento utilizado foi o A15 Bio Systems.

### **Avaliação da atividade antioxidante da saliva sobre o íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>)•**

A atividade quelante de íon ferroso pode ser utilizada como uma medida de atividade antioxidante (ADJIMANI, 2015). Com o intuito de avaliar o efeito quelante do íon ferroso pela saliva, esta foi misturada com 0,05 mL de FeCl<sub>2</sub> (2 mM) e 0,2 mL de ferrozina (5mM). A seguir, esta mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda 520 nm. O controle negativo foi feito com a utilização de FeCl<sub>2</sub>, ferrozina e metanol como veículo. A porcentagem de inibição foi determinada a partir da seguinte fórmula: % inibição = 100 x (controle – experimental) / controle (NEHIR EL; KARAKAYA, 2004). A leitura das absorbâncias das amostras foi feita utilizando o espectrofotômetro Edutec modelo EEQ9005.

### **Análise Estatística**

Para a análise estatística foram empregados os testes “*t*” de *student* pareado. Diferenças entre grupos em que  $p < 0,05$  foram consideradas significantes.

Foi utilizado o programa Graph PadPrism versão 6.0 para as análises estatísticas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A saliva pode variar na sua composição e quantidade pela influência de diversos fatores externos. Devido isso, na coleta salivar foi padronizado o tempo de coleta, o horário da última refeição, o horário da coleta, a posição do corpo, a natureza do estímulo e o tamanho do látex.

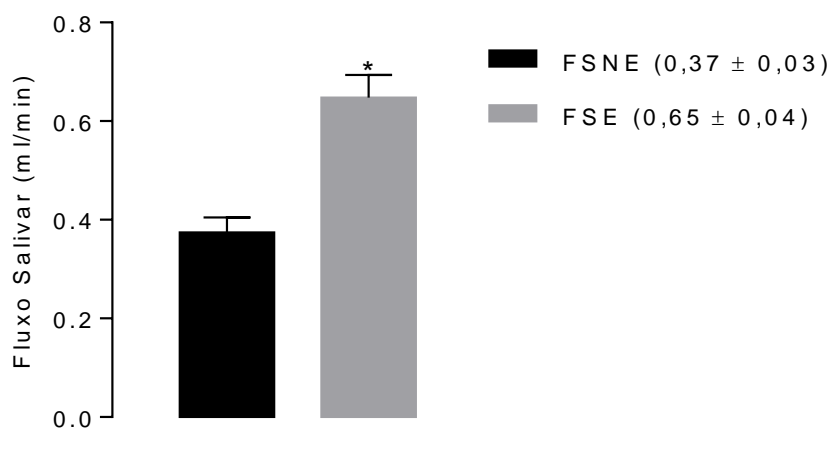
Em um dos fatores que sofre alteração, está à atividade antioxidante que é a primeira linha defesa contra o estresse oxidativo e que vem sendo amplamente estudado devido ao papel vital que exerce na manutenção da saúde do ambiente bucal. (BATTINO et al., 2002). Diferenças em resultados de pesquisa podem ser justificado por possuírem diferentes métodos na coleta da saliva. A secreção da saliva obtida após um estímulo modifica sua composição, porque durante a mastigação há o aumento da liberação do fluido crevicular e gengival o que pode alterar a produção de componentes específicos da saliva (MOORE, et al.,1994).

No presente estudo buscou-se avaliar a variação antioxidante entre a saliva estimulada e não estimulada, bem como a variação do fluxo salivar nos diferentes

tipos de coleta. Foram analisadas as amostras de 42 estudantes do curso de odontologia da Universidade Federal de Campina Grande. Entre os participantes, 77% eram do gênero feminino e 23% do gênero masculino, a média de idade era de  $21,17 \pm 0,73$  anos para o gênero feminino e de  $21,17 \pm 0,34$  para o gênero masculino.

Foram coletados inicialmente dados referentes à variação de volume do fluxo salivar estimulado e não estimulado. Na figura 1, observa-se que a média do fluxo salivar não estimulado foi de  $0,37 \pm 0,03$  ml/min, sendo significativamente menor que a média do fluxo salivar estimulado ( $0,65 \pm 0,04$  ml/min). Segundo Tomamsi( 2013), o fluxo salivar é considerado normal quando os valores estão entre 0,26 ml/min e 0,35 ml/min para a saliva não estimulado e  $<1$  ml/min para a saliva estimulada. Estando os valores da saliva não estimulada dentro do padrão de normalidade e da estimulada dentro da média que pra ele entre 0,7 a 0,9ml/min.

**Figura 1** – Valores do fluxo salivar estimulado e não estimulado do grupo estudado. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizado o teste “t” de *student* pareado. (\* $p < 0,05$ )

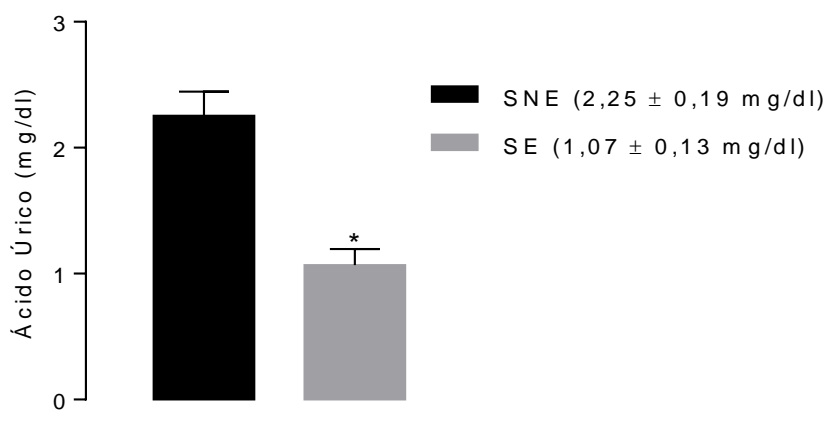


ALVES,2017

Como forma de avaliar a atividade antioxidante foi dosado o ácido úrico por ser conhecidamente o principal composto com atividade antioxidante, representando mais de 85% da atividade antioxidante total da saliva de indivíduos saudáveis (BATTINO et al., 2002, MOORE et al., 1994). Dados da literatura revelam que a diminuição do ácido úrico é o principal responsável pelo redução da capacidade antioxidante da saliva na doença periodontal humana (MIRICESCU et al., 2013). devido a isso é de suma importância o conhecimento de sua variação nos diferentes métodos de coleta . Ao ser investigado os valores de ácido úrico (figura 2) na saliva

observou-se que as concentrações de ácido úrico encontrados na saliva não estimulada ( $2,25 \pm 0,19$  mg/dl) foram significativamente maiores que aqueles encontrados na saliva na saliva estimulada ( $1,07 \pm 0,13$ mg/dl). Como relatado em outros estudos a quantificação dos marcadores antioxidantes na saliva podem variar de acordo com o estímulo empregado para obtenção da amostra salivar (NAGLER et al., 2002).

**Figura 2** – Valores do ácido úrico na saliva estimulado e não estimulado do grupo estudado ( n=36). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizado o teste “t” de *student* pareado. (\*p < 0,05 )



ALVES,2017

O ferro é um metal de extrema importância para a manutenção das funções vitais. A sua deficiência pode trazer consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante. Por outro lado, o excesso de ferro é danoso para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) que normalmente participam do mecanismo de defesa contra microrganismos e células tumorais. Um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e as enzimas que protegem o organismo contra os seus danos causam um estresse oxidativo que pode está diretamente relacionado com diversas patologias (JOMOVA et al., 2010; MIN et al., 2011; BEAUMONT, 2006; MARKS, 2006).

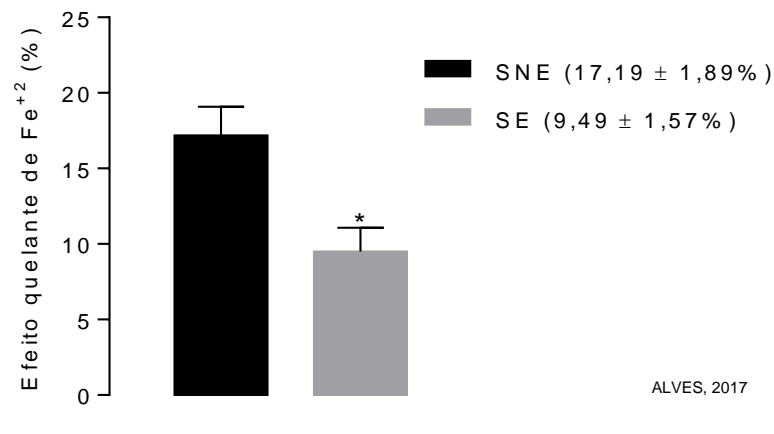
Metais de transição como o ferro catalisam a formação de radicais livres, que são minimizados pela ligação dos íons a proteínas de armazenamento e de transporte, que agem como quelantes, e assim minimizam a formação de hidroxila (OH•). No entanto o excesso do superóxido promove a redução do  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  que



matém a formação dos radicais de hidroxila, que causam danos ao DNA, proteínas, membranas lipídicas e outras moléculas (OH•) (KUMAR, 2006).

Ao ser investigada a atividade quelante do íon  $\text{Fe}^{2+}$  (figura 3), foram verificados valores significativamente maiores no FSNE com média de  $17,19 \pm 1,89\%$  em relação ao FSE com média de  $9,49 \pm 1,57\%$ .

**Figura 3** – Efeito quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  (% do controle negativo) na saliva estimulada e não estimulada do grupo estudado (n = 42). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizado o teste “t” de *student* pareado. (\*p < 0,05)



## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados, pode-se concluir que há diferenças entre o fluxo salivar estimulado e não estimulado, sendo a atividade antioxidante maior no fluxo salivar não-estimulado para os parâmetros avaliados. A concentração de ácido úrico e a atividade quelante de íon  $Fe^{2+}$  foram significativamente maiores na saliva coletada pelo método não-estimulado. São necessários mais estudos para poder estabelecer valores padrões para cada tipo de coleta para diferentes agentes antioxidantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao CNPq e ao programa PIVIC/UFCG pelo apoio técnico-científico.

## REFERÊNCIAS

ADJIMANI, J. P; ASARE, P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. **Toxicology reports**, v. 2, p.721-728, 2015

BATTINO, M. et al. The antioxidant capacity of saliva. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 3, p. 189–194, 2002.

BEAUMONT ,C; VAILONT , S. Iron homeostasis. In: BEAUMONT, C; BERIS, P; BEUZARD ,Y; BRUGNARA, C, Ed. **Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis**. Genova, Italy: Forum Service Editore; p.393-406, 2006.

FEJERSKOV O; KIDD E. **Cárie Dentária: A Doença e seu Tratamento Clínico**. 2. ed. São Paulo: L Santos, 2012. 640p.

JOMOVA, K; VONDRAKOVA ,D; LAWSON, M; VALKO, M.. **Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders**. *Molecular and Cellular Biochemistry* 345: 91-104. 2010

LAVIE, L. **Obstructive sleep apnoea syndrome - An oxidative stress disorder***Sleep Medicine Reviews*, 2003.

KUMAR, V; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. Robbins e Contran- **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006

MARKS ,D.B. **Basic medical biochemistry**. 2nd ed. Philadelphia: Williams&Williams; 2006.

MIN, B; MCCLUNG AM; CHEN, M. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. **Journal of Food Science** , v.76: 117-126, 2011

MIRICESCU, D.; TOTAN, A.; CALENIC, B.; MOCANU, B.; DIDILESCU, A.; MOHORA, M.; SPINO, T.; GREABU, M. Salivary biomarkers: Relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, p.1-6, 2013.

MOORE, S. et al. Antioxidant Activity of Saliva and Periodontal Disease. **Free Radical Research**, v. 21, n. 6, p. 417–425, 1994.

MOURA, S. A. B. et al. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 2, p. 187– 194, 2007.

MUSSAVIRA, S.; DHARMALINGAM, M.; SUKUMARAN, B. O. Salivary glucose and antioxidant defense markers in type II diabetes mellitus. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 141–147, 2015.

NAGLER, R.M.; KLEIN, I.; ZARZHEVSKY, N.; DRIGUES, N.; REZNICK, A.Z. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, n.3, p.268–277, 2002.

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. September 1993, p. 72–77, 1993.

NEHIR EL, S.; KARAKAYA, S. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 67, 2004.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 148, p. 183–193, 2016.

SCULLEY, D. V; LANGLEY-EVANS, S. C. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. **Clinical Science (London, England : 1979)**, v. 105, p. 167–172, 2003.

TOMMASI, M.H. **Diagnóstico em: patologia bucal**. P.283. 4ed, Rio de Janeiro: Elsevier,2013.