

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE LOUISE LEMES

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA EM DIFERENTES
TEMPOS DE ESTÍMULO

CURITIBA

2015

ALINE LOUISE LEMES

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA EM DIFERENTES
TEMPOS DE ESTÍMULO

Dissertação apresentada ao curso de Pós
Graduação em Odontologia, Setor de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Paraná,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar
Céspedes

CURITIBA

2015

Lemes, Aline Louise

Análise do estresse oxidativo da saliva em diferentes tempos de estímulo / Aline Louise Lemes – Curitiba, 2015.

58 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. José Miguel Amenábar Cespedes

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Saliva. 2. Antioxidantes. 3. Oxidantes. 4. Tempo. I. Amenábar Cespedes, José Miguel. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

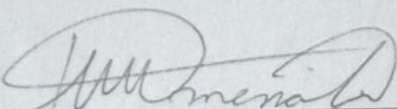
ALINE LOUISE LEMES

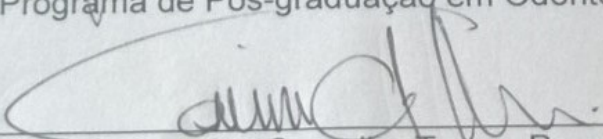
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

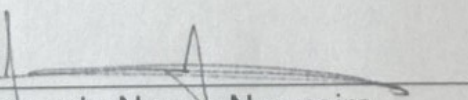
ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA EM DIFERENTES
TEMPOS DE ESTÍMULOS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes
Programa de Pós-graduação em Odontologia, UFPR


Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira
Programa de Pós-graduação em Odontologia, UFPR


Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira
Departamento de Estomatologia, USP

Curitiba, 31 de julho de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus pais João e Eunice e às minhas queridas irmãs Larissa e Fernanda, por sempre estarem ao meu lado nos momentos felizes e, principalmente, por me ajudarem a superar as minhas fraquezas e limitações nos momentos difíceis. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

“Bendito o homem que confia no Senhor e cuja esperança é o Senhor. Por que ele é como a árvore plantada junto às águas, que estende as suas raízes para o ribeiro e não receia quando vem o calor, mas a sua folha fica verde; e, no ano de sequeidão, não se perturba, nem deixa de dar fruto” (Jr. 17.7-8).

A Deus, por sempre estar ao meu lado, e me surpreender com sua Graça e Misericórdia todos os dias. Por me capacitar e tornar realidade um sonho. Te amo meu Senhor e Salvador!

Aos meus pais, João Pereira Lemes Neto e Eunice de Jesus Lemes, por sempre me incentivarem a estudar. Vocês são meu porto seguro, meu exemplo e presentes, de Deus, em minha vida. Obrigada de coração por nunca desistirem de mim. E hoje, graças a vocês, estou aqui realizando um sonho. Nós conseguimos! Amo vocês.

À minha irmã e melhor amiga, Larissa Marcelli Lemes Paris, seu carinho, sua parceria, sua amizade, e o seu amor incondicional me ajudaram a chegar até aqui. A distância só me faz perceber que eu te amo cada dia mais. Obrigada Lari, você é uma das pessoas que mais admiro na minha vida, minha inspiração, te amo demais, você é TOP!

À minha linda irmãzinha Fernanda Luiza Lemes, o seu jeitinho de demonstrar amor é muito especial e capaz de melhorar o meu dia. Continue assim, as suas cartinhas lindas sempre me motivam. Te amo muito!

Ao meu querido cunhado Vinicius Silvino Paris, por ser uma pessoa tão íntegra, inteligente e generosa. Eu agradeço todas as milhões de vezes que você me ajudou traduzindo artigos, explicando os conteúdos complexos, corrigindo meus textos. Vini, meu irmão querido, Obrigada!

À minha vó Maria Ramos Dornel e minha tia Ivanilda Aparecida Dornel, por sempre me motivarem a estudar, dizendo lindas palavras de incentivo; com certeza se não fosse esse apoio de vocês, desde a época da graduação, eu não teria chegado até aqui. Obrigada de coração!

À Universidade Federal do Paraná, foi um sonho realizado, poder me graduar e pós graduar nessa instituição. Ter um aperfeiçoamento profissional maravilhoso. Que orgulho! Obrigada por todos esses anos de estudo!

A todos os professores do Programa do Mestrado, foi uma honra ter sido aluna de vocês, obrigada por todo conhecimento acrescentado, sem vocês esse sonho não seria possível. Obrigada de coração!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Miguel Amenábar, pela oportunidade de trabalhar junto contigo novamente. Eu aprendi muito mais do que apenas conhecimentos profissionais, obrigada pelo convívio nesses dois anos, pela imensa paciência comigo, durante a prática laboratorial, e também pela compreensão com os meus horários apertados. Obrigada maestro!

À Prof.^a Dr^a Juliana Lucena Schussel, pelo convívio agradável no laboratório, você é uma pessoa incrível, o seu bom humor ajudava a aliviar as tensões laboratoriais. Ju, te admiro muito!

“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente.” (Machado de Assis)

A todos os meus colegas de mestrado, cada um do seu jeito marcou a minha vida, e todos foram importantes nessa etapa. Obrigada!

À Josi Karla Amadeu, minha dupla querida e parceira nesses dois anos. Obrigada pelo convívio agradável (eu dava muita risada contigo) e pela parceria e amizade.

Às minhas queridas amigas do mestrado Andrea Castro, Jeniffer Kula e Marta Nuernberg.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram nessa etapa! Todos vocês foram importantes. Muito Obrigada! *“O quão feliz é uma pessoa depende da profundidade de sua gratidão”.* (John Miller)

“O **SENHOR** é o meu pastor, nada me faltará.
Ele me faz descansar em pastos verdes e me
leva a águas tranquilas. O **SENHOR** renova as
minhas forças e me guia por caminhos certos,
como ele mesmo prometeu. Ainda que eu ande
por um vale escuro como a morte, não terei
medo de nada. Pois tu, ó **SENHOR DEUS**,
estás comigo; tu me proteges e me diriges.
Preparas um banquete para mim, onde os
meus inimigos me podem ver. Tu me recebes
como convidado de honra e enches o meu
copo até derramar. Certamente a tua *bondade*
e o teu *amor* ficarão comigo enquanto eu viver.
E na tua casa, ó **SENHOR**, morarei todos os
dias da minha vida”

Salmos 23

RESUMO

Pesquisas avaliando os parâmetros do estresse oxidativo da saliva em diferentes condições sistêmicas e bucais têm aumentado. No entanto, não há uniformidade no tempo de coleta de saliva para este tipo de análise. Como a composição da saliva varia de acordo com muitos fatores, incluindo o tempo de estímulo glandular, o objetivo deste estudo foi analisar as variações de alguns parâmetros do estresse oxidativo da saliva estimulada ao longo de 10 minutos de coleta, para avaliar possíveis alterações das amostras, nos diferentes intervalos. As amostras de saliva de indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 19 e 38 anos, foram coletadas durante 10 minutos em intervalos de 02 minutos. Para cada saliva coletada nos diferentes minutos (2, 4, 6, 8 e 10) foram determinados: a quantidade de saliva produzida, o estado oxidante total (EOT), a capacidade antioxidante total (CAT) e o índice de estado oxidativo (IEO). Todas as análises foram realizadas em triplicata e o EOT e o CAT foram determinados utilizando testes colorimétricos. Os resultados foram analisados com o teste de ANOVA para medidas repetidas. O teste de esfericidade de Mauchly foi aplicado, e sempre que este teste foi violado, as correções técnicas necessárias foram feitas usando o teste de Greenhouse-Geisser. Sempre que o teste F indicou significância estatística, a análise foi complementada por meio do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os resultados foram considerados positivos quando $p < 0,05$. Não houve diferenças estatísticas entre a quantidade de saliva produzida nos diferentes tempos de coleta. Foi observado que a concentração de oxidantes totais tem maior variação ao longo do tempo de coleta da saliva estimulada, enquanto que a capacidade antioxidante total permanece estável. O IEO apresentou variação ao longo dos dez minutos. De acordo com os resultados, observa-se que a saliva pode ser coletada como amostra segura a partir do segundo minuto de estimulação. Sugere-se que os dois primeiros minutos de estimulação sejam descartados devido a maior variação, e que seja estipulado um único intervalo de coleta, a fim de diminuir as variações das concentrações.

Palavras-chave: Saliva, Antioxidantes, Oxidantes, Tempo.

ABSTRACT

Recent research efforts have focused on evaluating the parameters of oxidative stress in saliva under various systemic and oral conditions. However, there is typically no uniformity for the saliva collection time for these types of analyses. Nonetheless, saliva composition has been shown to vary according to many factors, including the time of glandular stimulation. Thus, here we aimed to analyze the variations in oxidative stress parameters of stimulated saliva over a 10 min collection period. Saliva samples from individuals of both sexes, aged between 19 and 38 years, were collected for 10 min at 2 min intervals. The amount of saliva produced in each 2 min period was measured, as well the total oxidant state (TOS), the total antioxidant capacity (TAC) and oxidative state index (OSI). All analyzes were performed in triplicate and the EOT and CAT were determined using colorimetric tests. The results were analyzed using ANOVA for repeated measures. Mauchly's sphericity test was applied and, when violated, the necessary technical corrections were made using the Greenhouse-Geisser test. Whenever the F test indicated statistical significance, the analysis was complemented by the Bonferroni multiple comparison test. We found no significant difference between the amounts of saliva produced across the collection times. The concentration of total oxidants was variable over the stimulated saliva collection time, however, the total antioxidant capacity remains stable. The OSI increased over the 10 min collection period. Based on our findings, we recommend that saliva is best collected during the 3rd minute after stimulation, with the first 2 min of stimulation being discarded due to greater variation. The single collection interval should be stipulated to allow better inter-study comparisons.

Key words: Saliva, Antioxidants, Oxidants, Time

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	MÉDIA DO FLUXO SALIVAR (mL/min) NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO.....	37
GRÁFICO 2-	VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES TOTAIS (mM) NAS AMOSTRAS DE SALIVA NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO.....	38
GRÁFICO 3-	VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIDANTES TOTAIS (μM) NAS AMOSTRAS DE SALIVA NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO.....	39
GRÁFICO 4-	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES TOTAIS E OXIDANTES TOTAIS.....	40
GRÁFICO 5-	MÉDIA DO ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS AMOSTRAS DE SALIVA.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS PRESENTES NA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.....	29
TABELA 2-	PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS PRESENTES NA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.....	29
TABELA 3-	ARTIGOS DA LITERATURA QUE UTILIZAM A SALIVA PARA MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO, TEMPOS DE COLETA E PARÂMETRO UTILIZADO.....	31-32
TABELA 4-	MÉDIAS E DESVIOS- PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIDANTES TOTAIS, ANTIOXIDANTES TOTAIS E ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS DIFERENTES TEMPOS DE COLETA.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AO – Antioxidante

CAT – Capacidade Antioxidante Total

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EO - Estresse Oxidativo

EOT - Estado Oxidante Total

GPx – Glutaciona Peroxidase

GRX – Glutaciona Redutase

GSH – Glutaciona Reduzida

GSSG – Glutaciona Oxidada

IEO – Índice de Estresse Oxidativo

MDA – Malondialdeído

NACL- Cloreto de sódio

PMN - Polimorfonucleares

RL – Radicais Livres

RNA - Ácido ribonucleico

SOD – Superóxido Dismutase

TROLOX- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxílico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. SALIVA.....	15
3.1.1. Alteração da composição salivar conforme o fluxo.....	15
3.2. SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO.....	17
3.3. DESENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
3.3.1. Radicais livres.....	18
3.3.2. Antioxidantes.....	21
3.3.3. Estresse oxidativo.....	23
3.3.3.1. Doenças sistêmicas relacionadas ao estresse oxidativo.....	24
3.3.3.2. Doenças bucais relacionadas ao estresse oxidativo.....	26
3.4. SALIVA E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
3.5. MÉTODOS PARA AVALIAR O ESTRESSE OXIDATIVO SALIVAR.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Aspectos Éticos.....	33
4.2. Coleta das amostras.....	33
4.3. Análise bioquímica.....	34
4.4. Determinação da Capacidade Antioxidante Total.....	34
4.5. Determinação do Estado Oxidante Total.....	35
4.6. Determinação do Índice de Estresse Oxidativo.....	35
4.7. Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE.....	54
ANEXO I.....	56

1. INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido biológico, cuja composição é complexa, com capacidade de desempenhar inúmeras e importantes funções para a saúde bucal e sistêmica (RUDNEY, 1995; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; LAWRENCE, 2002; PUY,2006). Além das suas funções fisiológicas, a saliva tem se mostrado um fluido passível de mensuração, possibilitando o diagnóstico de doenças, assim como a extração de DNA e RNA, de proteínas, a realização de testes de drogas e a verificação de vários parâmetros do estresse oxidativo (LAWRENCE, 2002; LAMSTER; AHLO, 2007 LIMA *et al.*, 2010; YOSHIZAWA *et al.*,2013).

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são agentes oxidantes capazes de causar vários danos em nível de membrana celular, proteínas e DNA (SIES, 1991; VALKO, 2007; PHAM-HUY; HE e PHAM-HUY, 2008). Os antioxidantes são o mecanismo de defesa do organismo contra os agentes oxidantes, ao prevenir a ação desses agentes, bem como reparar os danos por eles causados (VALKO *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em condições de saúde, espera-se um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. O acúmulo de oxidantes pode gerar danos ao organismo, pois não há proteção contra a ação deletéria dos mesmos (KORACEVIC, 2001). Vários eventos, que envolvem processos biológicos, têm sido associados ao estresse oxidativo, tais como o envelhecimento e as doenças cardiovasculares, a artrite reumatoide, o câncer, a doença Alzheimer, a doença de Parkinson, dentre outras. (VALKO, 2007; PHAM-HUY; HE e PHAM-HUY, 2008). Na cavidade bucal, a doença periodontal, o líquen plano, a leucoplasia e o câncer bucal têm sido relacionados ao estresse oxidativo (DIAB-LADKI; PELLAT e CHAHINE; 2003; MIRICESCU *et al.*, 2011).

A saliva tem sido amplamente utilizada para análise dos parâmetros do estresse oxidativo em diferentes doenças (DIAB-LADKI; PELLAT e CHAHINE; 2003; PHAM-HUY; HE e PHAM-HUY, 2008; MIRICESCU *et al.*, 2011). A composição salivar, entretanto, pode variar de acordo com alterações no fluxo

salivar e tempo de estímulo (DAWES, 1967; DAWES, 1974; POLLAND; HIGGINS, 2003). Até o momento, não há um estudo que avalie as alterações nas concentrações de antioxidantes e oxidantes na saliva.

Por esse motivo, o objetivo do presente trabalho foi analisar as concentrações de antioxidantes totais, oxidantes totais e o índice de estresse oxidativo, contidos em amostras de saliva coletadas ao longo de dez minutos de estímulo.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar as concentrações de antioxidantes totais, oxidantes totais e o índice de estresse oxidativo em amostras de saliva coletadas ao longo de dez minutos de estímulo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SALIVA

A saliva é um fluido biológico produzido no interior das glândulas salivares. Em razão de sua complexa composição, é capaz de desempenhar funções imprescindíveis à manutenção da saúde, como por exemplo: a lubrificação dos tecidos duros e moles da cavidade bucal, a ação antimicrobiana, a manutenção da integridade da mucosa, a limpeza, a remineralização dental, a digestão, a fonação, dentre outras (RUDNEY, 1995; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; LAWERENCE, 2002; PUY,2006). Em sua composição, têm-se a presença de minerais, eletrólitos, tampões, enzimas, imunoglobulinas, mucinas e outros componentes. Quando secretada na cavidade bucal, é denominada saliva total, pois há a junção das secreções de todas as glândulas salivares com células epiteliais descamadas, microrganismos, neutrófilos, proteínas, fluido crevicular gengival, restos alimentares, secreção das vias aéreas superiores e células sanguíneas (RUDNEY, 1995; CARPENTER, 2013; YOSHIZAWA *et al.*,2013).

O fluxo salivar pode variar individualmente, e, ao longo do dia, pode sofrer pequenas alterações. Considerando-se como normais, os valores do fluxo para saliva não estimulada, acima de 0,1mL/min e para saliva estimulada, de 0,2mL/min (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; LAWERENCE, 2002; ALMEIDA *et al*, 2008).

3.1.1. Alteração da composição salivar conforme o fluxo

As glândulas salivares produzem e secretam diferentes conteúdos. As secreções podem ser serosas, mucosas ou mistas. A glândula parótida produz uma secreção serosa, rica em íons e enzimas. As glândulas menores produzem uma saliva do tipo mucosa, que contém mucinas (glicoproteínas) e apresenta

pouca ou nenhuma atividade enzimática. E, por fim, as glândulas sublinguais e submandibulares secretam um conteúdo misto, contendo saliva dos tipos serosa e mucosa (HUMPRHEY; WILLIAMSON, 2001).

Em condições normais, ou seja, quando não há a presença de estímulo gustativo ou mecânico, o percentual de contribuição das glândulas se distribui da seguinte forma: as parótidas são responsáveis por aproximadamente 20% da saliva presente na cavidade bucal, a submandibular, responsável por 65 a 70%, as sublinguais, 7 a 8% e as glândulas salivares menores, por 10%. (HUMPRHEY; WILLIAMSON, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2008). Quando são utilizados estímulos gustativos, como ácidos ou gomas de mascar, há um aumento no fluxo salivar. Nessa condição, a saliva passa a ser chamada de estimulada, pois a composição do fluido na cavidade bucal é modificada, de modo que a maior produção passa a ser das glândulas parótidas, que se tornam responsáveis por 60% da saliva presente na cavidade oral (HUMPRHEY; WILLIAMSON, 2001; CARPENTER, 2013).

Diversos fatores são capazes de alterar o fluxo salivar. Tais alterações podem variar de indivíduo para indivíduo, e também no mesmo indivíduo em diferentes circunstâncias. A hidratação do corpo, o uso de tabaco, a postura corporal, o uso de medicamentos, a estimulação da saliva, algumas enfermidades, dentre outros fatores, são capazes de gerar alterações na produção de saliva. (ALMEIDA *et al.*, 2008). O estímulo da saliva gera um aumento no fluxo salivar e alterações na sua composição (DAWES, 1967; DAWES, 1974; POLLAND; HIGGINS; ORCHARDSON, 2003).

As proteínas presentes na saliva são afetadas pelo aumento do fluxo salivar (DAWES, 1969; DAWES, 1974). Componentes como os íons sódio, cálcio, magnésio, cloro, bicarbonato, fosfato inorgânico, a força iônica e até o pH, dentre outros, podem sofrer alterações em razão do aumento do fluxo salivar (DAWES, 1974; POLLAND; HIGGINS; ORCHARDSON, 2003). Tanto nas glândulas parótidas quanto nas submandibulares, há um aumento nos eletrólitos e no pH, de acordo com o aumento do fluxo salivar (DAWES; KUBIENIEC, 2004). A composição da saliva oriunda da glândula submandibular é fortemente dependente da taxa do fluxo salivar (DAWES, 1974).

Quando ocorre um aumento súbito do fluxo salivar, as glândulas são capazes de responder prontamente a esse aumento, aumentando a liberação de

alguns eletrólitos e proteínas (FROEHLICH; PANGBORN; WHITAKER, 1987). Com relação ao tempo de estímulo, as glândulas salivares podem manter uma secreção alta de proteínas por longos períodos de estimulação. Por isso, quando a saliva secretada pela parótida sofre um aumento no fluxo, devido a um estímulo, há uma alteração na sua composição, pois ocorre uma variação nas concentrações de cálcio e proteínas (DAWES, 1969; DAWES; KUBIENIEC, 2004). Porém, alguns componentes salivares quando estimulados por muito tempo variam individualmente, de um até quinze minutos, até que haja uma produção parecida com a saliva não estimulada (DAWES, 1967).

Em razão das mencionadas alterações na composição da saliva decorrentes do estímulo, e a relação das alterações com a duração do estímulo, quando a saliva é coletada para ser utilizada em experimentos ou para fins diagnósticos, é necessário que se faça uma padronização do tempo de coleta, da taxa do fluxo e a duração da estimulação (DAWES, 1974).

3.2. SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO

Além das suas funções fisiológicas, a saliva é um fluido biológico útil no diagnóstico de doenças. Sua composição inclui enzimas, anticorpos, bactérias, vírus, eletrólitos, proteínas e outros componentes, razão pela qual a saliva tem-se mostrado uma excelente alternativa para análises clínicas (LAWERENCE, 2002; LAMSTER; AHLO, 2007; LIMA *et al.*, 2010; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

A utilização da saliva para avaliar o risco de cárie, mensurando sua capacidade tampão e conteúdo bacteriano, foi alvo de estudo durante muitos anos (SPIELMANN; WONG, 2011). Atualmente, a saliva também tem sido utilizada para o diagnóstico de doenças. Recentemente, avanços científicos e tecnológicos descobriram biomarcadores salivares específicos para um certo número de condições clínicas, incluindo o câncer, as doenças autoimunes e as doenças cardiovasculares (LAWERENCE, 2002; SPIELMANN; WONG, 2011; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Em relação ao exame de sangue, a saliva apresenta vantagens como a coleta não invasiva, a diminuição do estresse para o paciente e a baixa complexidade da técnica de coleta, que não requer equipe treinada, podendo ser coletada pelo próprio paciente. Há uma diminuição dos riscos de contaminação, as amostras de saliva apresentam fácil armazenamento e transporte, além de baixo custo (YOSHIZAWA *et al.*,2013).

Devido aos avanços da microbiologia, imunologia e bioquímica, os testes com amostras salivares têm sido reconhecidos como um meio prático e confiável para diagnósticos, análises clínicas e estudos incluindo a análise de DNA, proteínas, bactérias, vírus, o monitoramento do uso de drogas, e a análise de diferentes parâmetros de estresse oxidativo (SPIELMANN; WONG, 2011).

Os componentes presentes na saliva agem como um “espelho do corpo”, de sorte que o seu uso generalizado e crescente como meio de diagnóstico tem a finalidade de ajudar os pacientes, os pesquisadores e os profissionais da área da saúde, pois é um método não-invasivo e que proporciona amostras confiáveis (LAWERENCE, 2002; YOSHIZAWA *et al.*,2013).

3.3. DESENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.3.1. Radicais Livres

Radical livre (RL) é o termo designado a um átomo ou molécula que possua um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990 a). Por causa desse elétron desemparelhado, tais átomos e moléculas apresentam alta reatividade. No organismo, os RL são formados num cenário de reações de óxido-redução, em que ganham ou perdem o elétron desemparelhado, para que possam se estabilizar (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os RL são produzidos de forma endógena e exógena. A oxidação é parte fundamental do metabolismo e da vida aeróbica, na qual o oxigênio é a fonte

mais comum de RL em sistemas biológicos. São denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), os radicais livres que possuem o elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio, e de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), os RL que apresentam o elétron desemparelhado centrado nos átomos de nitrogênio. Esses dois tipos de espécies reativas representam as principais formas presentes no organismo, sendo as ERO as mais importantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Um exemplo de fonte endógena de ERO está na cadeia de transporte de elétrons e na gama de enzimas oxidases (BERRY; HARE, 2004; NOHL; GILLE; STANIEK, 2005). Elas atuam nas diferentes funções biológicas, como no metabolismo do oxigênio, na fagocitose, na produção de energia, na regulação do crescimento celular, na apoptose, dentre outras (CADENAS, 1989; JACOBSON, 1996; FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A produção de RL de forma exógena ocorre através do contato com fatores externos, tais como a exposição aos raios ultravioletas, o uso de forma direta ou indireta de cigarro, xenobióticos e quimioterápicos, pois eles são capazes de induzir o aumento de oxidantes no organismo (KOCYGIT; EREL; GUR, 2001; KOSECIK *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As ERO têm sido constantemente estudadas, uma vez que alterações biológicas são capazes de produzir um aumento na carga de oxidantes, por meio do excesso de RL no organismo. Esse aumento está associado a vários eventos biológicos e inúmeras doenças (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

As principais ERO são classificadas em dois diferentes grupos: os radicalares e os não radicalares. Dentre os radicalares, os principais são a hidroxila, o superóxido, a peroxila, hidroperoxila e a alcooxila; e entre os não radicalares, estão o oxigênio singlete, o ozônio, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BATTINO *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O radical hidroxila é o mais reativo e também o mais deletério ao organismo, pois possui uma meia-vida muito curta, e, uma vez formado, não há um mecanismo de defesa contra ele, conseqüentemente, o radical acaba reagindo com uma série de endobióticos, causando modificações no DNA, danos às proteínas, gerando a inativação de enzimas e destruição de membranas. O

radical hidroxila é formado, principalmente, pela reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição (conhecidas como reações de Fenton e Haber-Weiss) e também pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007)

O radical superóxido é gerado como resultado de vários processos celulares na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e do microsomo, através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, ou ainda pela redução do oxigênio (NOHL; GILLE; STANIEK, 2005). Em meio aquoso é um oxidante fraco, porém pode formar um tipo de ERN, o peroxinitrito, que é considerado um ótimo microbicida (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O oxigênio singlete é produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações, e é a forma mais deletéria de oxigênio, pois pode gerar ou fazer um papel intermediário na toxicidade fotoinduzida do oxigênio em organismos vivos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O peróxido de hidrogênio é resultado da dismutação do ânion-radical superóxido por enzimas oxidases, localizadas nos peroxissomos ou pela beta-oxidação de ácidos graxos. Ele é capaz de atravessar as camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana dos eritrócitos e com proteínas ligadas ao Ferro; e em presença de Ferro, gera hidroxila e torna-se altamente tóxico para as células (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As reações do peróxido de hidrogênio são catalisadas por metais como o ferro e o cobre; sendo o ferro, o metal de transição mais abundante no organismo. As reações de Fenton e Haber-Weiss, que são reações de oxido-redução catalisadas pelos metais de transição, levam à redução do peróxido de hidrogênio, com formação de subprodutos altamente reativos e danosos ao organismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BATTINNO *et al.*, 1999).

O organismo está sujeito às ações constantes das ERO e ERN. Quando há um excesso na produção, principalmente de ERO, ou quando a produção perdura por longos períodos, pode ocorrer um efeito tóxico, que resulta na disfunção dos processos fisiológicos, pois sua alta reatividade leva a um ataque contra as macromoléculas celulares, podendo danificar tecidos e células (MCCORD, 1993; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

3.3.2. Antioxidantes

Toda vez que os RL são produzidos, o organismo possui um mecanismo de defesa para combatê-los, os antioxidantes (AO). Em condições normais, há um equilíbrio entre ação dos RL e dos AO. Segundo Halliwell, “*antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*” (HALLIWELL, 2000).

Os AO podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, podendo ser produzidos endogenamente ou obtidos através da alimentação. As principais enzimas antioxidantes são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GRX) (GATÉ *et al.*, 1999). As enzimas AO estão envolvidas diretamente na neutralização dos RL, e o sistema antioxidante enzimático está predominantemente presente no meio intracelular (VASCONCELOS *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

A primeira linha enzimática de defesa contra os RL é a SOD, que catalisa a reação do ânion superóxido, formando peróxido de hidrogênio, por redução. O oxidante formado é transformado em água e oxigênio, pela catalase ou GPx. A enzima GPx faz a remoção do peróxido de hidrogênio, e o utiliza para oxidar a glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). Além do peróxido de hidrogênio, a GPx atua sobre peróxidos residuais de ácidos graxos, nas membranas e lipoproteínas, reduzindo também os hidroperóxidos (GATÉ *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm seu sítio ativo no selênio (Se), obtido através da dieta; ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina), e ligado a cisteína em alimentos de origem animal (selenocisteína). Devido a sua forma de obtenção há uma recomendação de sua inclusão na alimentação (VASCONCELOS *et al.*, 2007; PHAM-HU; HE; PHAM-HUY, 2008).

A GRx é uma enzima do tipo flavoproteína, sendo dependente da NADPH e da integridade da via das pentoses. Ela é capaz de regenerar a GSH em GSSG utilizando NADPH como uma fonte redutora (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os AO não enzimáticos são classificados em metabólicos (endógenos) e nutrientes (obtidos diretamente da dieta). Os metabólicos são produzidos pelo organismo, através do metabolismo, como por exemplo: a glutathione, a L-arginina, a coenzima Q10, a melatonina, o ácido úrico, a bilirrubina, a transferrina, dentre outros (GATÉ *et al.*, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

Os nutrientes são compostos que não podem ser produzidos pelo organismo, por isso, é necessário que haja uma complementação nutricional para que possam atuar na frente de defesa antioxidante. São exemplos de nutrientes: a vitamina E (tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), o betacaroteno (os carotenóides), a ceruloplasmina, metais (selênio, magnésio e o zinco) e flavonoides (GATÉ *et al.*, 1999). Dessa forma, uma dieta balanceada é importante para que não haja uma depleção na função AO. O tipo de AO, bem como a sua ação, dependerá do tipo de RL a ser combatido e local de sua ação (CADENAS, 1989; HALLIWELL, 1995).

A junção dos vários tipos de AO é denominada de capacidade antioxidante total (CAT), considerada como o equilíbrio entre os seus componentes, de modo que tal cooperação entre os diversos AO possui uma ação protetora maior sobre os ataques dos RL do que a ação individual de cada AO (HALLIWELL, 1995; GATÉ *et al.*, 1999).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (RL) e o sistema de defesa AO. Esse sistema de defesa pode agir em três linhas, as quais são definidas de acordo com a ação que o AO promove. Uma delas atua como detoxificadora do agente, agindo antes que ocorra a lesão, ou seja, de forma preventiva. A segunda linha de AO é chamada “limpeza dos radicais”, pois é capaz de eliminar os RL. E, por fim, a última possui a função de reparar a lesão ocorrida (KORACEVIC, 2001; BATTINO *et al.*, 2002).

Os AO com função preventiva evitam o início das reações em cadeia dos radicais peróxidos, reduzindo a espécie molecular e impedindo a formação de RL, e agem sequestrando os metais de transição (ferro e o cobre) impedindo-os, também, de participar das reações. Os Antioxidantes preventivos são constituídos pela catalase, GPx e pelas proteínas que se ligam a metais (transferrina, ceruloplasmina e albumina) (KORACEVIC, 2001; VALKO, 2007).

Os AO que realizam a “limpeza dos radicais” são capazes de eliminar, como numa espécie de varredura, os RL do organismo, impedindo, assim, a iniciação e a propagação das reações em cadeia. Nesse subtipo de AO têm-se o ubiquinol, a vitamina E, a vitamina A, os carotenoides, o ácido úrico, o ácido ascórbico, a albumina e a bilirrubina (BATTINO *et al.*, 1999; BATTINO *et al.*, 2002).

Os AO com função de reparar a lesão ocorrida interceptam diretamente os RL, interrompendo a propagação das reações em cadeia. Integram essa categoria de antioxidantes a SOD, o ácido úrico, as proteínas com grupamento sulfidríla (tiol), o ácido ascórbico, a alfa-tocoferol, o GSH, e a bilirrubina. O ácido úrico exerce as duas funções, reparadora e preventiva, a primeira eliminando radicais de oxigênio, e a segunda formando um complexo estável com íons ferro (DAVIES *et al.*, 1986)

3.3.3. Estresse oxidativo

Quando ocorre um desequilíbrio entre os oxidantes e AO, devido a falhas na regeneração da CAT, há o acúmulo de RL no organismo, o qual é denominado de estresse oxidativo (EO). Esse acúmulo pode gerar efeitos prejudiciais ao organismo como, por exemplo, ataques e alterações das macromoléculas celulares, com conseqüente desenvolvimento de diversos eventos fisiopatológicos. Incluem-se nessas alterações: os danos à nível de membrana celular (peroxidação lipídica), danos ao DNA e às proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990b; SIES, 1991; VALKO, 2007; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

A peroxidação lipídica é o resultado do ataque dos radicais livres contra as membranas celulares e lipoproteínas, ocasionando alterações na estrutura e na permeabilidade, podendo levar à expansão do líquido intracelular, e risco de ruptura da membrana da célula e das organelas, gerando uma possível morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990b). É gerada após a interação de uma espécie reativa com a membrana que pode culminar numa reação em cadeia,

que após ser iniciada é capaz de afetar um grande número de moléculas lipídicas, resultando na formação de produtos citotóxicos e mutagênicos como o malondialdeído (MDA) e dienos conjugados. Apesar de seus efeitos nocivos ao organismo, os efeitos da peroxidação lipídica nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos estão presentes na resposta inflamatória, por exemplo (MCCORD, 1993; BATTINO *et al.*, 1999; VALKO, 2007).

O ataque às proteínas ocorre devido à presença de vários sítios reativos, e de ligação com metais, os quais são capazes de realizar reações de óxido-redução reversíveis. Essas reações, por sua vez, geram sinais capazes de serem reconhecidos por proteases específicas, culminando com a sua degradação e mudanças estruturais, com subsequente perda da atividade enzimática (BATTINO *et al.*, 1999). O dano oxidativo ao DNA acontece porque os RL têm a capacidade de atacar o açúcar presente na desoxirribose e nas bases purínicas e pirimidínicas (constituintes do DNA e RNA), quebrando as cadeias de DNA, levando a mutações e apoptose (ABDI; ALI, 1999, VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3.3.3.1. Doenças sistêmicas relacionadas ao estresse oxidativo

O câncer é gerado por um complexo processo que inclui alterações celulares e moleculares, mediadas por vários estímulos endógenos e exógenos. Lesões oxidativas em DNA estão presentes no seu desenvolvimento (VALKO *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007). As etapas de iniciação e promoção do câncer estão intimamente associadas a defeitos nos cromossomos e à ativação de proto-oncogenes. Sendo essas etapas induzidas pelos RL (ABDI; ALI, 1999).

Um dano comum ao DNA é a formação de bases hidroxiladas que interferem no crescimento normal das células, alterando a transcrição do gene, gerando mutações gênicas (VALKO *et al.*, 2006). O dano oxidativo ao DNA produz uma multiplicidade de modificações em sua estrutura, incluindo lesões nas bases dos açúcares e rupturas dos filamentos das proteínas do DNA. O uso de tabaco e inflamação crônica, resultante de doenças não infecciosas, são

exemplos de fontes de dano oxidativo ao DNA que podem contribuir para o desenvolvimento de câncer e outras neoplasias (SHA; KHAND; KHAND, 2015).

A doença cardiovascular é de etiologia multifatorial, e dentre os fatores de risco para o seu desenvolvimento têm-se a hipercolesterolemia, a hipertensão, o tabagismo, diabetes, a má alimentação, o estresse, a idade, a falta de exercícios físicos, dentre outros (VALKO *et al.*, 2007; CERIELLO, 2008).

O EO tem sido associado às doenças cardiovasculares, porém, ainda não se sabe se sua atuação se dá como causa primária ou secundária. Estudos mostram essa associação em uma variedade de doenças cardiovasculares, como na aterosclerose, na isquemia, na hipertensão, nas cardiomiopatias, na hipertrofia cardíaca e na insuficiência cardíaca congestiva (CERIELLO, 2008).

Em doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla, a esclerose lateral amiotrófica, a perda de memória e a depressão, têm sido investigada a relação com o EO (KARLIK *et al.*, 2015). Na doença de Alzheimer, o dano oxidativo desempenha um papel importante na perda de neurônios e na progressão da demência (CHRISTEN, 2000). No cérebro dos pacientes portadores de Alzheimer tem sido encontrado a presença de beta amiloide, um peptídeo tóxico que resulta do EO e desempenha um importante papel nos processos neurodegenerativos (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

As doenças inflamatórias pulmonares, como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica, são caracterizadas pela inflamação crônica, e pelo EO (MACNEE, 2001; CARAMORI; PAPI, 2004). Os oxidantes desempenham uma exacerbação da inflamação, por meio da ativação de diferentes quinases e fatores de transcrição (MACNEE, 2001).

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica das articulações e do tecido que as circundam, com a infiltração de macrófagos e células T ativadas. A patogênese da doença ocorre devido à geração de ERO e ERN no local da inflamação. O dano causado pelo EO ocorre devido ao aumento dos níveis de prostaglandinas e isoprostanos no soro e no fluido sinovial (VALKO *et al.*, 2007; BUCZKO; ZALEWSKA; SZARMACH, 2015).

O EO desempenha papel em uma variedade de doenças renais, como glomerulonefrite, nefrite túbulo intersticial, insuficiência renal crônica, uremia e

proteinúria. A nefrotoxicidade de certas drogas, como ciclosporina, gentamicina, tracolimus, ocorre, principalmente, através da peroxidação lipídica, resultado do EO (GALLE, 2001).

A degeneração macular e a catarata são relacionadas à idade e ao EO, responsável pela alteração de vários tipos de células do olho. Sob a ação dos RL, ocorre a degeneração das proteínas das células oculares, levando à formação da catarata. A exposição à radiação, a longo prazo, pode inibir a mitose da pigmentação, danificando os segmentos de fotorreceptores, e essa ação é associada a peroxidação lipídica (BEATTY *et al.*, 2000).

De acordo com essa importante associação entre eventos fisiológicos e desordens, estudos sobre EO e a CAT têm sido frequentes, e de grande importância (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). O EO pode ser mensurado em diversos fluidos corporais como suor, leite materno, urina, plasma, saliva, líquido cerebrospinal, sêmen, dentre outros (EREL, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3.3.3.2. Doenças bucais relacionadas ao estresse oxidativo

Há um aumento do EO nas doenças que acometem a cavidade bucal, tal como na doença periodontal, no câncer bucal, na ulceração aftosa recorrente, no líquen plano e na leucoplasia (DIAB-LADKI; PELLAT; CHAHINE; 2003; MIRICESCU *et al.*, 2011).

A doença periodontal, além de uma desordem local, tem sido associada a doenças como diabetes do tipo 1 e 2, à artrite reumatoide e às doenças cardiovasculares (ESEN *et al.*, 2012; SG *et al.*, 2014). Ela é causada por bactérias que ocasionam a destruição do tecido conjuntivo e do osso em torno da raiz do dente. O ataque bacteriano desencadeia a liberação de citocinas, as quais aumentam a atividade dos polimorfonucleares (PMN). Após a estimulação dos PMN pelos antígenos bacterianos, ocorre um colapso respiratório como resposta do hospedeiro à infecção, e nesse momento há uma grande formação e liberação de ERO.

A liberação de RL acaba gerando um dano oxidativo local (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; BALTACIOĞLU *et al.*, 2014 BUCZKO; ZALEWSKA; SZARMACH, 2015).

O líquen plano e a reação liquenóide bucal têm sido associados ao EO, pois a inflamação crônica associada aos longos períodos de danos oxidativos contra as lipoproteínas de membrana, geram mutações com potencial carcinogênico (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012). O MDA, em pacientes portadores de líquen plano, apresenta um nível mais elevado, e os AO apresentam valores reduzidos. O EO, a longo prazo, pode contribuir para o potencial de malignização, tanto no líquen plano como na leucoplasia (KUMAR SRIVASTAVA *et al.*, 2014).

As ERO são conhecidas por desempenhar um papel importante nos estágios de iniciação e promoção do câncer. O ataque ao DNA ocorre devido à ação dos RL, principalmente o radical hidroxila, que é capaz de induzir mudanças conformacionais no DNA, incluindo quebra de cadeia, modificação de bases, danos aos genes supressores de tumores e expressão de proto-oncogenes (ABDI; ALI, 1999).

Em pacientes com câncer bucal há uma diminuição dos níveis de enzimas AO, um aumento de peróxido de hidrogênio e do radical superóxido. O câncer bucal, frequentemente, é precedido por lesões com potencial de transformação maligna, como o líquen plano e a leucoplasia. Tanto o câncer como as lesões potencialmente malignas estão associadas ao estresse oxidativo, e, esse por sua vez, também é capaz de transformar um tecido sadio em tecido neoplásico (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; VLKOVÁ *et al.*, 2012).

3.4. SALIVA E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Dentre as suas inúmeras funções (digestão, mastigação, atividade antifúngica, atividade antibacteriana, atividade antiviral, lubrificação tamponamento, atuação no balanço hídrico, deglutição), a saliva pode ser considerada a primeira linha de defesa contra o EO na cavidade bucal, pois é

rica em AO, como ácido úrico, albumina, ácido ascórbico e enzimas antioxidantes (BATTINO *et al.*, 1999; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; GREABU *et al.*, 2007).

Vários eventos que acontecem na cavidade bucal, como a presença de inflamações gengivais e o uso de tabaco, podem gerar um aumento nos RL (BATTINO *et al.*, 2002; MIRICESCU *et al.*, 2011). Inclusive a mastigação de alguns alimentos pode provocar o aumento desses RL e promover uma peroxidação lipídica (CAĞLAYAN *et al.*, 2008). Por isso, a saliva tem um papel importante no controle e modulação dos danos oxidativos na cavidade bucal (GREABU *et al.*, 2007).

As ações antioxidantes da saliva compreendem a supressão da peroxidação lipídica dos alimentos ingeridos, inibindo o potencial mutagênico dos indutores de ERO e das ERN, que são efetivamente eliminados pelos componentes AO da saliva (GREABU *et al.*, 2007; MIRICESCU *et al.*, 2011).

A glândula parótida é a principal fonte de AO da saliva, quando comparada com as salivas provenientes das glândulas submandibular e sublingual (NAGLER, *et al.*; 2002). Os AO presentes nas glândulas parótidas têm a função de combater os RL, provenientes da alimentação, e, também, neutralizar as reações de Fenton e Haber-Weiss, responsáveis pela liberação de RL (GREABU *et al.*, 2007). A glândula parótida, todavia, tem uma pequena contribuição na saliva total em repouso, somente quando é estimulada, nas refeições, por exemplo, é que ela se torna responsável pela maior vazão de saliva na cavidade bucal (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A capacidade antioxidante total (CAT) da saliva é a junção de todos os antioxidantes presentes na cavidade bucal, e constitui a primeira linha de defesa contra os oxidantes ali presentes, apresentando-se reduzida em pacientes com líquen plano, câncer bucal, diabéticos e fumantes. Quando a saliva entra em contato com a fumaça proveniente do cigarro, perde a sua CAT e torna-se um ambiente produtor de oxidantes (NAGLER *et al.*; 2002; GREABU *et al.*, 2007; MIRICESCU *et al.*, 2011).

Na TABELA 1 e na TABELA 2, observam-se, respectivamente, os principais AO enzimáticos e AO não enzimáticos presentes na saliva e suas principais funções.

TABELA 1 - PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS PRESENTES NA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	FUNÇÃO	AUTOR
Peroxidase Salivar	É a enzima antioxidante mais importante presente na saliva, e também possui uma ação antibactericida. Na saliva de pacientes fumantes e/ou com câncer bucal apresenta-se reduzida.	Nagler <i>et al.</i> ; 2002 Greabu <i>et al.</i> ; 2007
Superóxido Dismutase (SOD)	Apresenta um papel antioxidante secundário, capaz de atuar como mediador inibitório da inflamação mediada por neutrófilos. Apresenta uma redução em pacientes com câncer bucal.	Nagler, <i>et al.</i> ; 2002
Ceruloplasmina	Liga os íons metálicos.	Greabu <i>et al.</i> ; 2007

FONTE: A Autora (2015)

TABELA 2 - PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS PRESENTES NA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.

ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO	FUNÇÃO	AUTOR
ÁCIDO ÚRICO	Principal antioxidante encontrado na saliva e no fluido crevicular gengival, é responsável por grande parte da atividade antioxidante total da saliva, possui uma ação potente na limpeza do ácido hipocloroso e oxigênio singlete, reage com a hidroxila e faz ligação com os íons ferro e cobre.	Battino, <i>et al.</i> ; 2002; Nagler, <i>et al.</i> ; 2002
ALBUMINA	Presente na saliva e fluido crevicular gengival, aparece em menor quantidade quando comparado ao ácido úrico, possui uma ação preventiva, ao ligar-se aos íons metálicos, é um antioxidante de limpeza, apresenta níveis reduzidos quando em presença de estresse oxidativo.	Battino <i>et al.</i> ; 2002; Greabu, <i>et al.</i> ; 2007
GLUTATIONA	Mesmo em baixas concentrações apresenta uma significativa função de limpeza, promove regulação de citocinas na doença periodontal, tem ação protetora na cavidade bucal contra o estresse oxidativo induzido por íons metálicos de materiais dentários.	Battino, <i>et al.</i> ; 2002; Nagler, <i>et al.</i> ; 2002
ÁCIDO ASCÓRBICO	Apresenta-se concentrado no fluido crevicular gengival em relação ao plasma, possui uma atuação parecida com a da albumina, tem ações de limpeza e prevenção, regenera a vitamina E (tocoferol), em pacientes fumantes é capaz de evitar o dano oxidativo causado pela fumaça do cigarro.	Battino, <i>et al.</i> ; 2002; Greabu, <i>et al.</i> ; 2007

FONTE: A Autora (2015)

3.5. MÉTODOS PARA AVALIAR O ESTRESSE OXIDATIVO SALIVAR

A saliva tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a avaliação dos parâmetros do estresse oxidativo. Observa-se, na TABELA 3, que a maior parte dos estudos utiliza apenas alguns marcadores do dano oxidativo como o MDA, por exemplo, ou os AO enzimáticos e não enzimáticos separados, e a CAT, porém, poucos trabalhos avaliam o EOT, a CAT e o IEO juntos.

Segundo Erel (2004), a medição da CAT é capaz, não apenas, de mensurar os antioxidantes totais presentes na saliva e refletir com precisão o estado dos antioxidantes totais no organismo, como também é utilizada para avaliar indiretamente a atividade dos RL e, através da avaliação do EOT, tem-se a atividade dos RL. Porém, quando mensurados de forma separada, não há como definir um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e oxidantes; e seria interessante mensurá-los, uma vez que o dano oxidativo ocorre quando há esse desequilíbrio (EREL, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007)

Observa-se, também, na TABELA 3, que não há uma padronização nos tempos de coleta, muitos trabalhos sequer especificam na metodologia o tempo em que a coleta da saliva foi realizada. Não existem trabalhos na literatura que definam o tempo ideal para a coleta de amostras viáveis para mensuração dos parâmetros do estresse oxidativo, bem como trabalhos que mostrem o que acontece na amostra biológica em diferentes tempos de estímulo.

TABELA 3 - ARTIGOS DA LITERATURA QUE UTILIZAM A SALIVA PARA MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO, TEMPOS DE COLETA E PARÂMETRO UTILIZADO.

Autor	5 minutos	A partir de 10 minutos	Não descreve	Parâmetro
Abdolsamadi <i>et al.</i> , 2011	-	X	-	Ácido Úrico, SOD, GPx e peroxidase
Agha-Hosseini <i>et al.</i> , 2012	-	-	X	CAT e MDA
Ahmadi-Motamayel <i>et al.</i> , 2013	X	-	-	CAT
Al- Rawi <i>et al.</i> , 2011	X	-	-	Ácido Úrico, SOD, GSH
Arana <i>et al.</i> , 2006	X	-	-	GSH, GPx, GRX
Baltacioglu <i>et al.</i> , 2014	X	-	-	MDA, EOT, CAT E IEO
Brock <i>et al.</i> , 2004	X	-	-	CAT
Buduneli <i>et al.</i> , 2006	-	-	X	GSH, Ácido Ascórbico e CAT
Cağlayan <i>et al.</i> , 2008	X	-	-	EOT, CAT e IEO
Cunha-Correia <i>et al.</i> , 2014	-	X	-	SOD, GPx, Ácido Úrico
De Sousa <i>et al.</i> , 2015	-	X	-	SOD, MDA, Acido Urico , Vitamina C, peroxidase, proteína total, CAT
Diab-Ladki, Pellat Chahine; 2003	X	-	-	Xantina- Xantina oxidase, proteínas totais e CAT
Gümüs <i>et al.</i> , 2009	X	-	-	GSH, GSSG, Vitamina C, Acido Urico, CAT

Fonte: A Autora (2015)

contínua

TABELA 3 - ARTIGOS DA LITERATURA QUE UTILIZAM A SALIVA PARA MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO, TEMPOS DE COLETA E PARÂMETRO UTILIZADO.

Autor	5 minutos	A partir de 10 minutos	Não descreve	Parâmetro
Kamodyová; Tótchova, 2013	-	-	X	CAT, proteínas totais, peroxidação lipídica
Karlík <i>et al.</i> , 2015	X	-	-	CAT, oxidação proteica e peroxidação lipídica
Lettrichová <i>et al.</i> , 2015	-	-	X	CAT
Liskmann <i>et al.</i> , 2007	X	-	-	Acido Úrico , Ácido Ascórbico, mieloperoxidase, CAT
Metgud; Bajaj, 2014	-	-	X	MDA e GSH
Özcan <i>et al.</i> , 2014	-	-	X	MDA
Prabhakar; Dodawad; OS, 2009	X	-	-	CAT e proteínas totais
Rai <i>et al.</i> , 2012	X	-	-	MDA, Vitamina C e E
Rai; Hegde; Jose, 2012	-	-	X	CAT
Sayedda; Ahmed, 2012	-	-	X	CAT
SG <i>et al.</i> , 2014	-	-	X	MDA
Shelty <i>et al.</i> , 2014	-	-	X	Glutationa e SOD
Shirzad <i>et al.</i> , 2014	-	-	X	CAT e peroxidação lipídica
Tunuloglu, Demirtas, Tunuloglu, 2006	X	-	-	CAT e proteínas totais
Zaleweska <i>et al.</i> , 2014	-	X	-	Peroxidase, SOD, Ácido Úrico e CAT
Yang <i>et al.</i> , 2014	-	-	X	SOD, CAT
Yigla , Berkovich , Nagler, 2007	-	X	-	CAT, Acido Úrico, peroxidase, SOD, Albumina, proteínas totais

FONTE: A autora (2015)

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná, com parecer de número 872.583. Os indivíduos participantes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação voluntária na pesquisa (ANEXO 1).

4.2. Coleta das amostras

Participaram do estudo 19 estudantes da Pós-Graduação da UFPR, de ambos os sexos, com idade entre 19 e 38 anos, sadios, não fumantes e que não faziam uso de nenhum medicamento.

A coleta da saliva foi realizada no laboratório de Bioquímica Bucal do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPR, entre 9h e 11h da manhã. Os participantes foram previamente orientados para comparecerem em jejum, bem como terem realizado a higiene bucal, 2h antes da coleta (NAVAZESH; CHRISTENSEN, 1982).

A saliva foi estimulada através de um pedaço de parafilme (2cm x 2cm), e coletada, separadamente, a cada dois minutos, até completar 10 minutos. Os participantes expeliram a saliva em tubos tipo Falcon de 10mL, devidamente etiquetados com o número do minuto de referência (2",4",6",8" e 10"), de modo que, ao final, cada indivíduo coletou 5 amostras de saliva, totalizando 95 amostras para o estudo.

Durante a coleta, os tubos foram armazenados em gelo. Após a coleta, foi realizada a medição do fluxo salivar com o auxílio de micropipetas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.030 x G (10.000 rpm), durante 4 minutos, e o sobrenadante foi colocado em microtubos plásticos estéreis, devidamente identificados com os respectivos tempos de estímulo. As

amostras de saliva foram armazenadas em freezer, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 15 dias até o momento da análise bioquímica.

4.3. Análise Bioquímica

Reagentes

Os reagentes *o*-dianisidina, sulfato de amônio e ferro (II) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-Carboxílico) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo – Brasil). O Alaranjado de Xilenol PA (tetrassódico) foi adquirido da empresa Cloroquímica (Curitiba – Brasil).

4.4. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A CAT foi determinada pelo método sugerido por Erel (EREL, 2004), otimizado para medição em saliva, e todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo 75mM de solução de Clark e Lubs (160mL de KCl (75mM) e 40 mL de HCl 37% (75mM), pH final 1,8), 10mM de *o*-dianisidina e 45 μM de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, foi realizada a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorvância de 450nm.

Após a leitura, foi adicionada uma alíquota de uma solução 7,5 μM de H_2O_2 , preparada na solução de Clark e Lubs, e após 4 minutos, uma nova leitura foi realizada.

A curva padrão foi feita com Trolox em PBS (pH 7,4). Os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em mmol equivalente de Trolox/L.

4.5. Determinação do Estado Oxidante Total (EOT)

O EOT foi determinado pelo método sugerido por Erel (EREL, 2005), otimizado para medição em saliva, e todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Uma alíquota de saliva de cada amostra foi adicionada a uma solução contendo: 150 μ M de xilenol, 140 μ M de NaCl, 90mL de H₂SO₄ 25 μ M e 10mL de glicerol 1,35M. Posteriormente, foi realizada a leitura das amostras em leitor de microplaca a uma absorvância de 550nm.

Após a leitura, foi adicionada uma alíquota de uma solução contendo: 5mM de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O e 10mM de *o*-dianisidina em 10mL de H₂SO₄ 25mM. Após 4 minutos, uma nova leitura foi realizada.

A curva padrão foi feita com H₂O₂. Os resultados foram determinados mediante a diferença das leituras e expressos em μ mol equivalente de H₂O₂/L.

4.6. Determinação do Índice de Estresse Oxidativo (IEO)

O IEO foi considerado como razão entre o EOT e a CAT (EREL, 2005). Para realizar o cálculo, a unidade do CAT foi ajustada de mmol equivalente de Trolox/L para μ mol equivalente de Trolox/L. O valor do IEO foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IEO} = \frac{\text{EOT}}{\text{CAT}} \times 100$$

4.7. Análise Estatística

Os dados foram tabulados e analisados utilizando o *software Statistical Package for Social Science - SPSS 20.0* (IBM, Chicago, IL). Para a determinação da curva de calibração, foi utilizado o teste de regressão linear. Para tratamento dos dados, foi utilizado análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. O teste de esfericidade de Mauchly foi aplicado, e sempre que este teste foi violado, as correções técnicas necessárias foram feitas usando o teste de Greenhouse-Geisser. Sempre que o teste F indicou significância estatística, a análise foi complementada por meio do teste de comparação múltipla de Bonferroni. O limite de significância estatística foi fixado em 5% ($P < 0,05$).

5.RESULTADOS

A média do fluxo salivar estimulado foi determinada para cada intervalo de tempo. Em média, o fluxo permaneceu constante ao longo dos 10 minutos (GRÁFICO 1). No primeiro intervalo (T2), a média do fluxo foi de 2,62mL/min ($\pm 1,09$), posteriormente, no minuto 4, o fluxo diminuiu para 2,04mL/min ($\pm 0,86$) e, a partir deste ponto, manteve-se praticamente constante nos tempos T6 (2,17mL/min $\pm 0,95$), T8 (2,01 mL/min $\pm 0,96$) e T10 (2,05 mL/min $\pm 0,98$).

O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade se cumpre para o efeito do fluxo salivar ao longo do tempo ($\chi^2(9) = 14,59$, $p > 0,05$). O fluxo salivar não foi afetado nos diferentes intervalos do estímulo, $F(0,91, 0,39) = 2,31$, $p = 0,07$, $\eta^2_p = 0,151$.

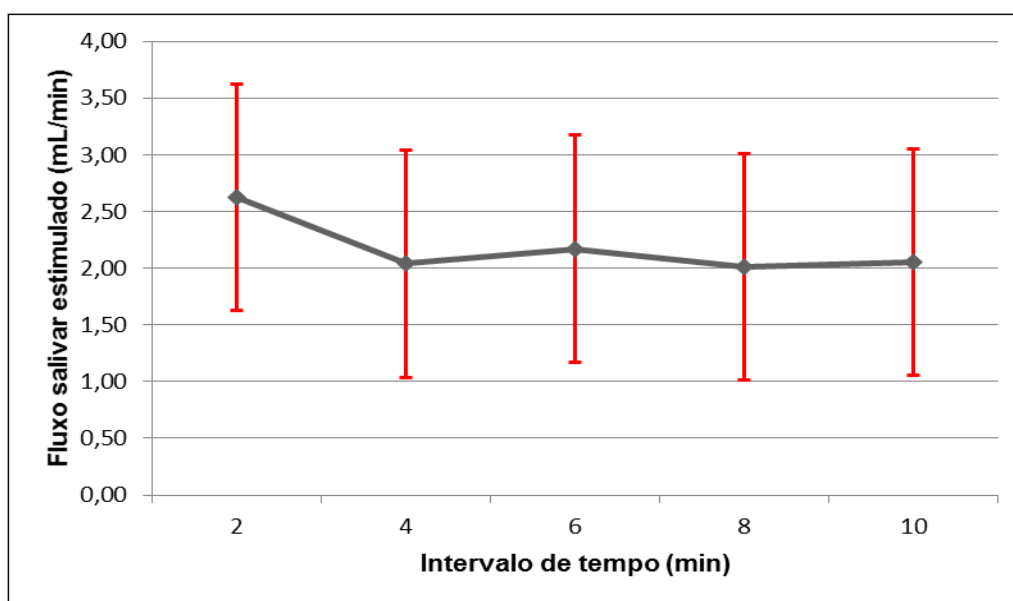


GRÁFICO 1 - MÉDIA DO FLUXO SALIVAR (mL/min) NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO. CURITIBA-PR, 2015.

FONTE: A AUTORA

A concentração de antioxidantes totais nas amostras de saliva apresentou alterações ao longo do tempo de estudo (GRÁFICO 2).

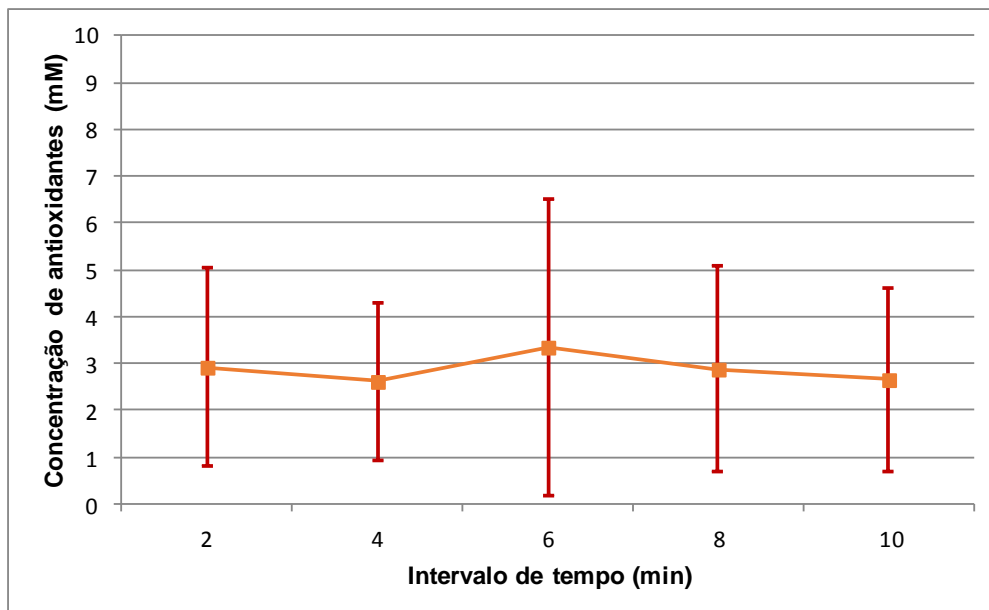


GRÁFICO 2 - VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES TOTAIS (mM) NAS AMOSTRAS DE SALIVA NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO. CURITIBA - PR, 2015

FONTE: A AUTORA

Entre T2 e o T4 houve uma diminuição na concentração de antioxidantes totais nas amostras, com um aumento entre os intervalos T4 e T6, e novamente a queda de concentração entre T6 e T10. O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade se cumpre para o efeito da concentração de antioxidantes ao longo do tempo ($\chi^2(9) = 8,74$, $p > 0,05$). A concentração de antioxidantes totais não foi afetada nos diferentes intervalos do estímulo, $F(1,53, 2,77) = 0,55$, $p = 0,7$, $\eta^2_p = 0,03$.

As concentrações de oxidantes totais também apresentaram variações ao longo do tempo (GRÁFICO 3). Houve uma queda na média das concentrações nos primeiros 2 minutos. Posteriormente, houve um aumento, com estabilização entre o minuto 6 e minuto 8, e novamente a concentração tende a aumentar, porém, com valores inferiores aos observados no T2.

O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade não se cumpre para o efeito da concentração de oxidantes ao longo do tempo ($\chi^2(9) = 37,75$, $p < 0,05$); por esse motivo, os graus de liberdade foram corrigidos com a estimação de esfericidade de Greenhouse-Geisser ($\epsilon = 0,553$). A concentração de oxidantes totais não foi afetada nos diferentes intervalos do estímulo, $F(25,23, 12,72) = 1,98$, $p = 0,147$, $\eta^2_p = 0,099$.

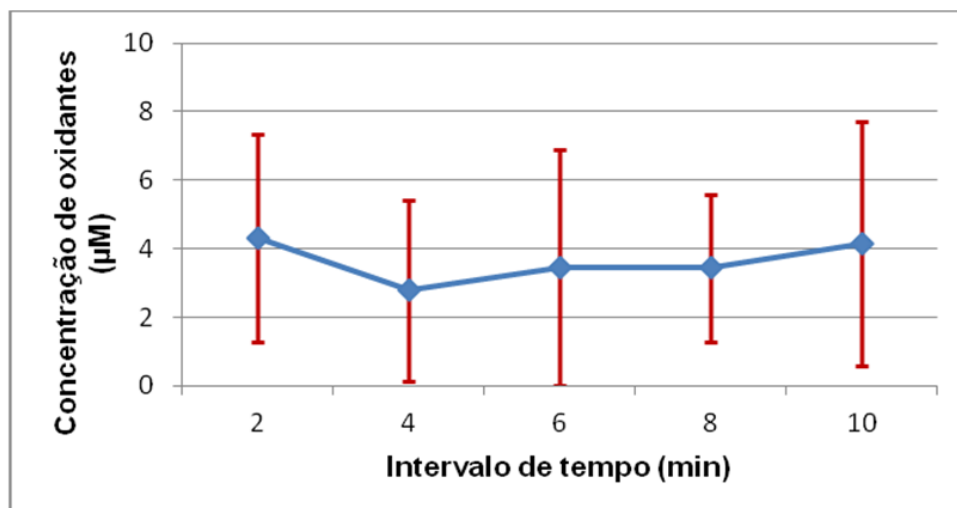


GRÁFICO 3 - VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIDANTES TOTAIS (μM) NAS AMOSTRAS DE SALIVA NOS DIFERENTES INTERVALOS DE ESTÍMULO. CURITIBA - PR, 2015

FONTE: A AUTORA

A comparação entre as concentrações de oxidantes totais e antioxidantes totais ao longo dos 10 minutos analisados pode ser observada no GRÁFICO 4.

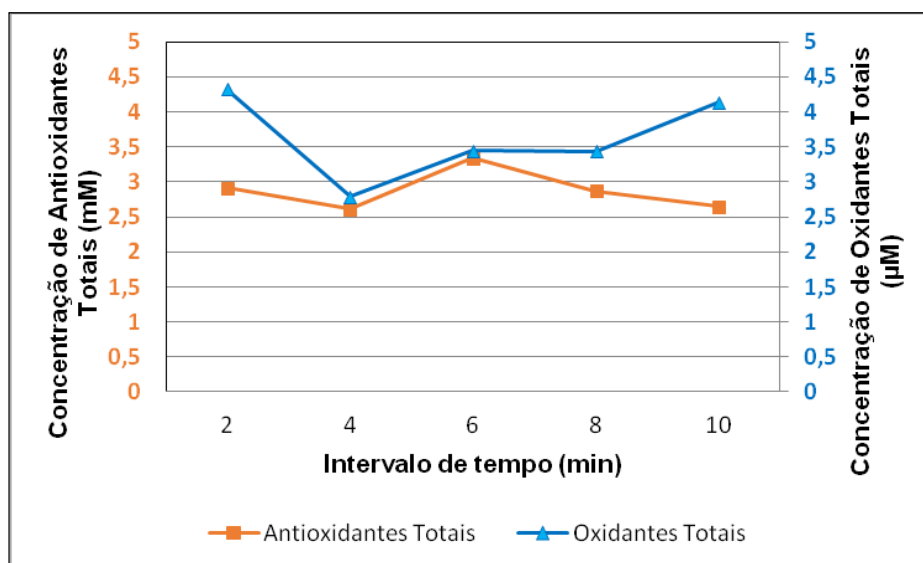


GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES E OXIDANTES TOTAIS. CURITIBA-PR, 2015

FONTE: A AUTORA

Em relação ao índice de estresse oxidativo, foi observado que há uma leve tendência de aumento ao longo do tempo de coleta (GRÁFICO 5). Primeiramente, houve um declínio entre T2 e T4, e, a partir de T4 até T8, há um aumento acentuado no índice. Já entre T8 e T10, o índice parece tornar-se mais estável.

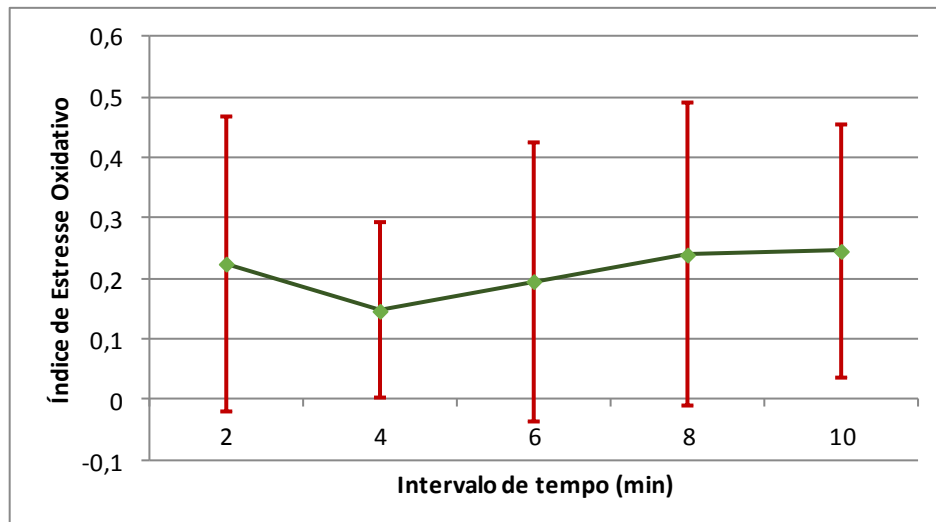


GRÁFICO 5 - MÉDIA DO ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS AMOSTRAS DE SALIVA. CURITIBA-PR, 2015

FONTE: A AUTORA

O teste de esfericidade de Mauchly indicou que a suposição de esfericidade se cumpre para o efeito do índice de estresse oxidativo ao longo do tempo ($\chi^2(9) = 13,37, p > 0,05$). O índice não foi afetado nos diferentes intervalos estudados, $F(0,32, 0,36) = 0,88, p = 0,48, \eta^2_p = 0,047$.

Os resultados obtidos, referentes às concentrações de oxidantes e antioxidantes e o índice de estresse oxidativo, ao longo dos 10 minutos, podem ser visualizados na TABELA 4, mostrando que não houve significância estatística nos diferentes tempos de coleta.

TABELA 4 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIDANTES TOTAIS, ANTIOXIDANTES TOTAIS E ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS DIFERENTES TEMPOS DE COLETA. CURITIBA-PR, 2015

	Minuto 2	Minuto 4	Minuto 6	Minuto 8	Minuto 10
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
Oxidantes Totais (μM)	4,33 (3,03)	2,79 (2,64)	3,44(3,43)	3,43(2,16)	4,13(3,57)
Antioxidantes Totais (mM)	2,91(2,12)	2,61(1,68)	3,34(3,16)	2,87(2,19)	2,65(1,95)
Índice de Estresse Oxidativo	0,224(0,244)	0,146(0,145)	0,195(0,231)	0,239(0,251)	0,245(0,209)

Teste Anova para medidas repetidas

FONTE: A AUTORA

6.DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou as concentrações de oxidantes totais e antioxidantes totais presentes na saliva, ao longo de 10 minutos de estímulo, e foi observado que essas concentrações permaneceram constantes ao longo do tempo.

Os dezenove participantes foram escolhidos por conveniência, com preferência por indivíduos saudáveis e sem comorbidades, para que não houvesse outras variáveis que pudessem interferir no estudo. Desta maneira, não foram incluídos no estudo indivíduos fumantes, com doenças, ou que apresentassem hipossalivação, bem como indivíduos que faziam o uso de medicamentos e/ou complementação vitamínica. Pois essas situações poderiam gerar valores destoantes, uma vez que são condições que podem alterar o estresse oxidativo.

Com relação ao fluxo salivar, não houve diferença significativa ao longo dos 10 minutos de estímulo. Dong, Puckett Jr. e Dawes (1995) analisaram o efeito de diferentes frequências de mastigação sobre a taxa do fluxo salivar, ao longo de 20 minutos, e constataram que elas não exerceram influência significativa sobre a taxa do fluxo salivar ao longo do tempo. Semelhantemente, Polland, Higgins e Orchardson (2003) não encontraram, também, relação entre a duração do estímulo da mastigação e as taxas do fluxo salivar durante 90 minutos, pois o fluxo apresentou estabilidade ao longo do tempo.

Ghezzi, Lange e Ship (2000) avaliaram as variações do fluxo salivar das glândulas parótida e submandibular ao longo de seis horas, e observaram que oscilações ocorrem e que, após um tempo, há uma tendência à estabilidade dos valores. No presente trabalho, apesar de não serem observadas diferenças significativas, podemos observar no GRÁFICO 1, que depois de dois minutos de estímulo, o fluxo salivar se torna mais estável. O aumento do fluxo salivar observado nos primeiros minutos da coleta, com o declínio subsequente, seguido de equilíbrio ao longo do tempo, foi encontrado também nos estudos de Dong, Puckett Jr. E Dawes (1995); Polland, Higgins e Orchardson (2003) e Dawes e Kubieniec (2004). Tal aumento do fluxo salivar, verificado nos primeiros dois minutos, provavelmente está associado à resposta rápida das glândulas ao

estímulo da mastigação mecânica (FROEHLICH; PANGBORN; WHITAKER, 1987).

No que diz respeito aos antioxidantes, também não foi observada diferença estatística na concentração ao longo do tempo. Dawes (1967, 1969 e 1974) avaliou a influência do fluxo salivar sobre as concentrações de proteínas, nas glândulas parótidas e submandibulares, constatando que a concentração de proteínas é dependente do fluxo salivar, sendo assim, quando o fluxo aumenta, as concentrações salivares de proteína também aumentam.

Por outro lado, Tunuloglu, Demirtas e Tulunoglu (2006) e Prabhakar, Dodawad e OS (2009) encontraram uma correlação entre o aumento da concentração de proteínas concomitantemente com o aumento dos antioxidantes na saliva. Como as proteínas são o principal constituinte do sistema antioxidante (BATTINO *et al.*, 2002), ao aumentar o fluxo, aumenta também a concentração de antioxidantes. No presente trabalho, não houve diferença no fluxo salivar, e isto pode explicar a manutenção da concentração dos antioxidantes ao longo do tempo de estudo.

A concentração de oxidantes também não sofreu diferença significativa. A manutenção das concentrações de oxidantes pode estar relacionada à estimulação para coleta da saliva. Rosenhek, MacPherson e Dawes (1993) mostraram que a dureza da goma de mascar para estimular o fluxo de saliva influencia o padrão da mastigação, e gera uma modificação do fluxo e na composição salivar. No presente trabalho, durante a coleta salivar, o filme de parafina utilizado foi trocado ao longo dos dez minutos, a cada troca ocorreu uma alteração na consistência da parafina, provocando um aumento da mastigação, e, como consequência, um possível aumento da peroxidação lipídica e da concentração de oxidantes, que, apesar da oscilação observada no gráfico 3, não apresentou diferença significativa em suas concentrações.

O IEO, que mede a razão entre oxidantes e antioxidantes, também não mostrou diferenças significativas. Esen *et al.* (2012), Baltacioğlu *et al.* (2014) sugeriram a importância da avaliação do IEO, ao invés de apenas a medição separada de antioxidantes e oxidantes, uma vez que essas concentrações sofrem constantes alterações. Logo, o IEO é importante na avaliação do equilíbrio entre as concentrações de oxidantes e antioxidantes. Dentre os trabalhos que utilizam a saliva como amostra para avaliar os parâmetros do

estresse oxidativo, a maioria não realiza a mensuração do IEO. Dos artigos levantados neste estudo, apenas Cağlayan *et al.* (2008) e Baltacıoğlu *et al.* (2014) realizaram esta medição na saliva. Sendo assim, pode-se sugerir que há uma necessidade da mensuração do IEO para poder avaliar se há desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, e considerar um potencial dano causado pelo estresse oxidativo.

No presente trabalho, a análise de CAT, EOT e IEO nos diferentes tempos de coleta não apresentou diferenças significativas no resultado. De acordo com o que foi observado, os autores sugerem que, a partir do primeiro intervalo, seja utilizado o menor tempo possível de coleta. Apesar de não haver diferença estatística do fluxo salivar ao longo do tempo, recomendamos considerar a variação ocorrida no primeiro intervalo, descartando, assim, os primeiros dois minutos de estímulo, esperando para que haja a estabilização do fluxo salivar para utilização da amostra. Dessa forma, verificou-se que o tempo de coleta de 3 a 4 minutos é confiável para se obter uma amostra adequada, dispensando longos períodos de estimulação que podem causar desconforto aos participantes dos estudos.

Os autores também sugerem que, quando selecionado o tempo para coleta, em futuros estudos que analisem o estresse oxidativo, o mesmo seja padronizado na metodologia para todos os indivíduos participantes do estudo, visando a evitar as alterações de concentrações nos diferentes minutos.

7.CONCLUSÃO

Dentro dos limites do estudo, pode-se concluir que as concentrações de oxidantes totais, antioxidantes totais na saliva, bem como o índice de estresse oxidativo, ao longo dos dez minutos de estímulo, não sofreram alterações significativas, podendo ser realizada a análise salivar em qualquer período de coleta dentro dos dez minutos.

REFERÊNCIAS

ABDI, S.; ALI, A. Role of ROS modified human DNA in the pathogenesis and etiology of cancer. **Cancer Letters**, v.142, p. 1-9, 1999.

ABDOLSAMADI, H. *et al.* Comparison of Salivary Antioxidants in Healthy Smoking and Non-smoking Men. **Chang Gung Medical Journal**, v. 41, n.6, p. 607-11, 2011.

AGHA-HOSSEINI, F. *et al.* Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with bucal lichen planus and bucal squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology e Medicine**, v.41, n. 10, p. 736-40, 2012.

AHMADI-MOTAMAYEL, F. *et al.* Total antioxidant capacity of saliva and dental caries. **Medicina Bucal, Patología Oral y Cirugía Bucal.**, v. 18, n. 4, p. 553-6, 2013.

ALMEIDA, P.D.V. *et al.* Saliva composition and functions: a comprehensive review. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 9, n.3, p. 1-11, 2008.

AL-RAWI, N.H. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. **Diabetes e Vascular Disease Research**, v. 8, n. 1, p. 22-8, 2011.

ARANA, C. *et al.* Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. **Journal of Oral Pathology e Medicine**, v.35, n.9, p. 554-9, 2006.

BALTACIOĞLU, E. *et al.* Lipid Peroxidation Levels and Total Oxidant/Antioxidant Status in Serum and Saliva From Patients With Chronic and Aggressive Periodontitis. Oxidative Stress Index: A New Biomarker for Periodontal Disease? **Journal of Periodontology**, v. 85, n.10, p1432-41, 2014.

BARREIROS, ALBS.; DAVID, JM.; DAVID, JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BATTINO, M. *et al.* Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Rev Critical Reviews in Oral Biology e Medicine**, v.10, n.4, p.458-476, 1999.

BATTINO, M. *et al.* The antioxidant capacity of saliva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 189-194, 2002.

BERRY, C.E.; HAR, J.M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **The Journal of Physiology**, v.555, n.3, p 589-606, 2004.

BEATTY, S. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v.45, p.115–134, 2000.

BROCK, GR. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p515-521, 2004.

BUDUNELLI, N. *et al.* Effects of smoking and gingival inflammation on salivary antioxidant capacity. **Journal of Clinical Periodontology**, v.33, n.3, p. 159-64, 2006.

BUCZKO, P.; ZALEWSKA, A.; SZARMACH, I. Saliva and oxidative stress in buccal cavity and in some systemic disorders. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.66, n.1, p.3-9, 2015.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 79-110, 1989.

CAĞLAYAN, F. *et al.* Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. **Oral Diseases**, v.14, n.8, p.700-4, 2008..

CARAMORI, G.; PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v.59, p.170-173, 2004.

CARPENTER, G.H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.4, p. 267-76, 2013.

CERIELLO, A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. **Diabetes Care**, v.31, n.2, p. 181-184, 2008.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p.621-9, 2000.

CUNHA-CORREI, A.S. *et al.* Enteral nutrition feeding alters antioxidant activity in unstimulated whole saliva composition of patients with neurological disorders. **Research in Developmental Disabilities**, v. 35, n.6, p1209-15, 2014.

DAWES, C. The effect of flow rate and length of stimulation on the protein concentration in human parotid saliva. **Archives of Oral Biology**, v.12, n.7, p. 783-8, 1967.

DAWES, C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. **Archives of Oral Biology**, v.14, n.3, p.277-94,1969.

DAWES, C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human submandibular saliva. **Archives of Oral Biology**, v.19, n.10, p. 887-95, 1974.

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

DAVIES, K.J. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. **The Biochemical Journal**, v. 235, n.3, p.747-54, 1986.

DE SOUSA, M.C. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. **Archives of Oral Biology**, v.60, n.4, p. 600-5, 2015.

DIAB-LADKI, R.; PELLAT, B.; CHAHINE, R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal disease. **Clinical Bucal Investigations**, v.7, p.103-107, 2003.

DONG, C.; PUCKETT, J.; DAWES, C. The effects of chewing frequency and duration of gum chewing on salivary flow rate and sucrose concentration. **Archives of Oral Biology**, v.40, n.7, p. 585-588, 1995.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n.2, p112-9, 2004. (a)

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.277-285, 2004. (b)

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v.38, n.12, p.1103-11, 2005.

ESEN, Ç. *et al.* The Effects of Chronic Periodontitis and Rheumatoid Arthritis on Serum and Gingival Crevicular Fluid Total Antioxidant/Oxidant Status and Oxidative Stress Index. **Journal of Periodontology**, v.83, n.6, p.773-9, 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, 61-8, 1997.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie.**, v.84, n.2-3, p.131-41, 2002.

FROEHLICH, D.A.; PANGBORN, R.M.; WHITAKER, J.R. The Effect of Bucal Stimulation on Human Parotid Salivary Flow Rate and Alpha-Amylase Secretion. **Physiology e Behavior.**, v.41,n.3, p.209-217, 1987.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.16, p.2135-2137, 2001.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.53, p.169-80, 1999.

GHEZZIL, E.M.; LANGE, L.A.; SHIP, J.A. Determination of Variation of Stimulated Salivary Flow Rate. **Journal of Dental Research**, v.79, n.11, p.1874-1878, 2000.

GREABU, M. *et al.* Could constitute saliva the first line of defence against oxidative stress? **Romonain Journal of Internal Medicine**, v.45, n.2, p.209-13, 2007.

GÜMÜŞ, P. *et al.* Salivary Antioxidants in Patients With Type 1 or 2 Diabetes and Inflammatory Periodontal Disease: A Case-Control Study. **Journal of Periodontology**, v. 80, n.9, p. 1440-6, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990. (a)

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v.280, n.1, p.1-8, 1990. (b)

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.10, p.1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v.355, p.1179-80, 2000.

HUMPHREY, SP.; WILLIAMSON, RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry** , v.85, p.162-9, 2001.

IANNITI, T.; ROTTIGNI, V.; PALMIERI, B. Role of free radicals and antioxidant defences in bucal cavity-related pathologies. **Journal of Oral Pathology e Medicine**, v. 41, n.9, p. 649-61, 2012.

JACOBSON, MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, v.21, n.3, p.83-6, 1996.

KAMODYOVÁ, N.; TÓTHOVÁ, L.; CELEC, P. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: influence of external factors. **Disease Markers.**, v.34, n.5, p. 313-21, 2013.

KARLÍK, M. *et al.* Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v.48, n.1-2, p.24-8, 2015.

KOCYIGIT, A.; EREL, O.; GUR, S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. **Clinical Biochemistry**, v.34, p.629-633, 2001.

KORACEVIC, D. *et al.* Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, p.356-361, 2001.

KOSECİK, M. *et al.* Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. **International Journal of Cardiology**, v.100, n.1, p.61-4, 2005.

KUMAR SRISTAVA, V. To Study the Prevalence of Premalignancies in Teenagers having Betel, Gutkha, Khaini, Tobacco Chewing, Beedi and Ganja Smoking Habit and Their Association with Social Class and Education Status. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.7, n.2, p.86-92, 2014.

LAMSTER, I.B.; AHLO, J.K. Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Bucal and Systemic Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1098, p.216-29, 2007.

LAWRENCE, H.P. Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. **Journal Canadian Dental Association**, v.68, n.3, p.170-4, 2002.

LETTRICHOVÁ, I. *et al.* Variability of salivary markers of oxidative stress and antioxidant status in young healthy individual. **Redox Report**, 2015 Apr.20.

LIMA, D.P. *et al.* Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.184-8, 2010.

LISKMANN, S. *et al.* Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. **Clinical Oral Implants Research**, v.18, n.1, p.27-33, 2007.

MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. **European Journal of Pharmacology**, v.429, p.195-201, 2001.

METGUD, R.; BAJAJ, S. Evaluation of salivary and serum lipid peroxidation, and glutathione in bucal leukoplakia and bucal squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Science**, v.56, n.2, p.135-42, 2014.

MCCORD, J.M. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical Biochemistry**, v.26, p.351-357, 1993.

MIRICESCU, D. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in bucal diseases. **Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology**, v.15, n.2, p.139-143, 2011.

NAGLER, R.M. *et al.* Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology e Medicine**, v.32, n.3, p.268-77, 2002.

NAVAZESH, M.; CHRISTENSEN, C.M. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. **Journal of Dental Research**, v.61, n.10, p. 1158-1162, 1982.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v.69, n.5, p.719-23, 2005.

ÖZCAN, S.S.A. *et al.* Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Fixed Orthodontic Appliances. **Diseases Markers**, v.2014, p.1-8, 2014.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v.4, n.2, p.89-96, 2008.

POLLAND, K.E.; HIGGINS, F.; ORCHARDSON, R. Salivary flow rate and pH during prolonged gum chewing in humans. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.30, p.861-865, 2003.

PRABHAKAR, A.R.; DODAWAD, R.; OS, R. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children—An In Vivo Study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.2, n.1, p.9-12, 2009.

PUY, C.L. The rôle of saliva in maintaining bucal health and as an aid to diagnosis. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.11, n.5, p. 449-55, 2006.

RAI, B. *et al.* Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. **Journal of Oral Science**, v.52, n.2, p.251-6, 2010.

RAI, K.; HEGDE, A.M.; JOSE, N. Salivary antioxidants and bucal health in children with autism. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.8, p.1116-20, 2012.

ROSENHEK, M.; MACPHERSON, L.M.D.; DAWES, C. The effects of chewing-gum stick size and duration of chewing on salivary flow rate and sucrose and bicarbonate concentrations. **Archives of Oral Biology**, v.38, n.10, p.885-91, 1993.

RUDNEY, J.D. Does variability in salivary protein concentrations influence bucal microbial ecology and bucal health? **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.6, n.4, p.343-367, 1995.

SAYEDDA, K.; AHMED, Q.S. Salivary Total Antioxidant Activity as a Non Invasive Biomarker for Oxidative Stress In Asthmatic Patients. **National Journal of Integrated Research in Medicine**, v.3, n.1, p.8-12, 2012.

SG, R. *et al.* Correlation of Plasma Lipid Profile with Salivary Oxidative Stress Markers in Type II Diabetes Mellitus Patients. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n.6, p.08-10, 2014.

SHAH, AA.; KHAND, F.; KHAND, TU. Effect of smocking on serum xanthine oxidase, malondialdehyde, ascorbic acid and α -tocopherol levels in healthy male subjects. **Pakistan Journal of Medical Science**, v.31, n.1, p.146-9, 2015.

SHETTY, S.R.S. *et al.* Interdependence of Antioxidants and Micronutrients in Bucal Cancer and Potentially Malignant Bucal Disorders: A Serum and Saliva Study. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v.11, n.6, p.696-702, 2014.

SHIRZAD, A. *et al.* Salivary Total Antioxidant Capacity and Lipid Peroxidation in Patients with Erosive Bucal Lichen Planus. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v.8, n.1, p.35-9, 2014.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v.91, n.3C, p.31S-38S, 1991.

SPIELMANN N., WONG D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Disease**, v.17, n.4, p.345-354, 2011.

TULUNOGLU, Ö; DEMIRTAS, S.; TULUNOGLU, I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.16, n.3, p.186-91, 2006.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, Metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico- Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VASCONCELOS *et al.*, 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimica Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VLKOVÁ, B. *et al.* Salivary markers of oxidative stress in patients with bucal premalignant lesions. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.12, p.1651-6, 2012.

ZALEWSKA, A. *et al.* Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.43, n.1, p.61-8, 2014.

YANG, P.S. *et al.* Scaling-Stimulated Salivary Antioxidant Changes and Oral-Health Behavior in an Evaluation of Periodontal Treatment Outcomes. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-8, 2014.

YIGLA, M.; BERKOVICH, Y.; NAGLER, R.M. Oxidative stress indices in COPD-
Broncho-alveolar lavage and salivary analysis. **Archives of Oral Biology**, v.52,
n.1, p.36-43, 2007.

YOSHIZAWA, J.M. *et al.* Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and
Diagnostic Utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.781-91, 2013

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, José Miguel Amenábar, Josi Karla Amadeu, Aline Lemes e Juliana Schussel, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) Senhor(a) a participar de um estudo intitulado “Avaliar a capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento”. Este estudo visa criar um método de coleta e armazenamento de saliva para estudos futuros.

- a) O objetivo desta pesquisa é avaliar os componentes químicos presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 10 minutos uma única vez. A coleta deverá ser realizada com intervalo de uma hora após a refeição e/ou com mesmo intervalo da última higiene bucal. Para a coleta, deverá permanecer sentado verticalmente em local confortável e antes do início da coleta será solicitado que degluta a saliva presente na cavidade bucal. Então, após cada 30 segundos, despejará a saliva secretada dentro de um recipiente devidamente identificado. O tempo de coleta será controlado pelo examinador com o auxílio de um cronômetro digital. A saliva coletada será armazenada em freezer para posterior análise. Após finalizado o estudo, o material será guardado por 90 dias e então descartado.
- c) Para tanto você deverá comparecer na clínica da disciplina de Estomatologia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná (Av. Lothário Meissner, 632) para realização da coleta que não deverá tomar mais do que 20 minutos do seu tempo.
- d) Apesar de não haver risco previsível aos participantes da pesquisa, você poderá sentir leve desconforto e ressecamento da boca pelo longo período de coleta proposto.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: obter a melhor maneira de utilizar a saliva em estudos científicos. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- f) O pesquisador José Miguel Amenabar, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 3360-4024 ou pelo email: jamenaba@gmail.com, ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632, para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. O Sr.(a) poderá ainda solicitar outras informações as demais colaboradoras do estudo: Josi Karla Amadeu: jkamadeu@gmail.com Aline Lemes: all.louise@hotmail.com Juliana Schussel : juiana.schussel24@gmail.com
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado

<p>Rubricas:</p> <p>Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____</p> <p>Pesquisador Responsável _____</p> <p>Orientador _____ Orientado _____</p>

<p>Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR –CEP:80060-240 Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

- h) As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do Participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR Rua Pe.
Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR –CEP:80060-240 Tel (41)3360-
7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO I

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.

Pesquisador: José Miguel Amenábar Céspedes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34644414.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 872.583

Data da Relatoria: 03/11/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto proveniente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, sob responsabilidade do Prof. José Miguel Amenábar Céspedes, com participação das mestrandas Josi Karla Amadeu e Aline Louise Lemes e colaboração de Juliana Lucena Schussel. As atividades serão realizadas no Laboratório de Biologia Bucal até setembro de 2015.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a capacidade antioxidante total, estado oxidante total e índice de estresse oxidativo presentes na saliva em diferentes tempos de coleta e diferentes temperaturas de armazenamento.
- Estabelecer e validar a melhor metodologia de uso da saliva para estudos de diagnóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este estudo pode gerar desconforto e ressecamento da boca devido ao longo período de coleta proposto. Como benefícios deverá resultar na criação de um protocolo otimizado de coleta e armazenamento de saliva para estudos de diagnóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os participantes deverão comparecer em um único dia pré estabelecido para coleta de saliva e

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.080-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 072.503

serão abordados na clínica de Odontologia da UFPR, onde receberão as informações necessárias e assinarão o TCLE caso concordem em participar do estudo.

Participarão do estudo 20 pessoas de ambos os sexos com idades entre 20 e 40 anos que serão recrutados por meio de cartazes na clínica de Odontologia da UFPR. As amostras de saliva serão coletadas em recipientes descartáveis, estéreis, por um período de dez minutos. A coleta deve ser realizada com intervalo de uma hora após a refeição e com mesmo intervalo da última higiene bucal. O participante será orientado a permanecer sentado verticalmente em local confortável e antes do início da coleta será solicitado que degluta a saliva presente na cavidade bucal. Então, após cada 30 segundos, despejará a saliva secretada dentro de um recipiente devidamente identificado. Uma alíquota da saliva de cada tempo será utilizada para imediata avaliação e o restante será estocado a -20 °C e -80 °C em freezer durante 30, 60 e 90 dias, quando serão repetidas as análises. As amostras serão descartadas após 90 dias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente anexados.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas. Sou de parecer favorável à aprovação do projeto.

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

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

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cosmetica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 072.503

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 14 de Novembro de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br