

EDUARDO GRIGOLLO PATUSSI

**AÇÃO DE SUCOS DE LARANJA E REFRIGERANTE SOBRE  
CAPACIDADE TAMPÃO, PH, CÁLCIO E FOSFATO SALIVAR  
DE CRIANÇAS – ESTUDO *IN VIVO***

Florianópolis

2007

EDUARDO GRIGOLLO PATUSSI

**AÇÃO DE SUCOS DE LARANJA E REFRIGERANTE SOBRE  
CAPACIDADE TAMPÃO, PH, CÁLCIO E FOSFATO SALIVAR  
DE CRIANÇAS – ESTUDO *IN VIVO***

*Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em  
Odontologia - Área de Concentração  
Odontopediatria*

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida

Florianópolis

2007

EDUARDO GRIGOLLO PATUSSI

AÇÃO DE SUCOS DE LARANJA E REFRIGERANTE SOBRE CAPACIDADE TAMPÃO,  
PH, CÁLCIO E FOSFATO SALIVAR DE CRIANÇAS – ESTUDO *IN VIVO*

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC.

Florianópolis, 10 de julho de 2007.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida

- Orientadora -

---

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida

*Orientadora*

---

Prof. Dr. Ricardo Sousa Vieira

*Membro*

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Michele da Silva Bolan

*Membro*

---

Prof. Dr. Bruno Carlini Jr.

*Membro*

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Inês Beatriz Rath

*Membro*

*Pai e Mãe, Bruno e Helena, muito obrigado! Somente muito obrigado é pouco e vocês sabem disso. Então, quero deixar aqui escrito que não vale nada a conquista de um diploma sem que se tenha uma família. Vocês são exemplos a serem seguidos de pessoas, de amigos e, principalmente, de pais. Agradeço por terem investido na minha educação e por terem acreditado em mim, dando-me apoio incondicional em todos os momentos. Amo muito vocês e, mais uma vez, obrigado!*

*À minha “quase” esposa Ana Elisa, escrevo aqui o que sempre lhe digo - obrigado por existir e fazer parte da minha vida. Uma grande etapa está terminando, e a sua ajuda foi fundamental. Agora estamos começando um novo desafio, com muitos sonhos pela frente, mas tenho certeza de que, juntos, vamos fazer com que eles aconteçam. Amo você, cada vez mais!*

*... A vocês dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Os inúmeros desafios que surgiram nestes anos de Pós-Graduação fizeram com que eu fosse cada vez mais fortalecido ao encontro dos meus objetivos, sempre consciente de que não é preciso prejudicar ninguém para alcançá-los com êxito. Por isso, agradeço a todos os que fizeram e que fazem parte da minha história, do meu presente e do meu futuro, em especial:

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida, pela orientação nesta tese, pelo apoio constante e pela amizade, a quem devo grande parte do profissional que sou hoje.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial àqueles da área de concentração Odontopediatria: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joeci Oliveira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José Carvalho Rocha, Prof. Dr. Ricardo Sousa Vieira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Bosco e à psicóloga Rosamaria Areal, minha gratidão e profundo orgulho de ter sido aluno de vocês, podendo absorver um pouco de suas experiências e ensinamentos, conquistando um estudo de excelente qualidade.

Às colegas do Doutorado – Ana Cristina, Ângela, Carla, Isabelita, Meire, Michele e Miriam pelo aprendizado e pela forte amizade semeada.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação da UFSC pelo breve convívio, em especial às amigas do mestrado que, agora, cursam o doutorado, Karin e Taís, com quem pude trocar muitas idéias e criar um forte vínculo.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina, pela prontidão e profissionalismo nos favores dispensados, em especial às secretárias da Odontopediatria, Ivalda e Beth e à secretária da Pós-Graduação, Ana Maria.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF), na pessoa de sua diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Salete Sandini Linden, pelo incentivo a minha qualificação e por me acolher e me integrar nesta casa.

Às minhas colegas da disciplina de Odontopediatria da FOUPF – Berenice Perussolo e Eloísa Helena Corrêa Brusco, por sempre me ensinarem, além de conhecimentos profissionais, postura, respeito e ética, fazendo dessa cadeira um lugar para se trabalhar com prazer e alegria, todos os dias.

À “dona” Olga, pelo bom convívio e enorme ajuda para “controlar” as crianças durante a parte clínica desta pesquisa.

Às ex-alunas e hoje colegas, Karina Fanfa e Graziela Ferrari, pelo grande apoio durante a execução desta tese.

Ao Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, em especial à Sirlei, cuja ajuda foi decisiva para a realização da parte laboratorial.

À professora e ex-colega de UPF, Caren Bavaresco, pela boa vontade em participar do desenvolvimento da parte metodológica deste estudo, ajudando-me com seus conhecimentos.

A todas as crianças que participaram voluntariamente desta pesquisa e que, mesmo “bagunçando” um pouco o ambiente, sempre foram muito responsáveis, solidárias e, principalmente, muito afetivas.

À Bioclin<sup>®</sup>, que disponibilizou gratuitamente os reagentes utilizados nesta pesquisa.

A todos os alunos da Faculdade de Odontologia, pela amizade e por proporcionarem um ótimo convívio nos dias de aulas e nos “churrascos” das turmas.

A todos meus amigos, com quem posso conversar fiado por horas e horas, sempre com momentos de “nostalgia”, lembrando histórias vividas e delas dando risadas, como também sobre assuntos um pouco mais sérios, mas nem por isso, sem diversão. Vocês sabem que foram fundamentais para que eu tenha alcançado esse objetivo, como também sabem que a amizade é essencial para todos os outros que ainda estão por vir.

E, por último, só para deixá-las mais nervosas, pois eu sei que vão estar pensando que eu as tinha esquecido, agradeço às minhas irmãs – Denise, Sandra e Márcia, como também a meus cunhados e meus sobrinhos, por juntos, fazermos de nossa família um exemplo, não para os outros, mas para nós mesmos, de confiança, amizade e carinho, consolidando a educação e o amor sempre oferecidos por nossos pais.

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2	METODOLOGIA EXPANDIDA .....	19
3	ARTIGOS	
3.1	Artigo 1 * – Versão em Português – Avaliação <i>in vivo</i> do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças .....	30
3.2	Artigo 1 * – Versão em Inglês – Evaluation of pH, buffer capacity and amount of salivary calcium and phosphate in children .....	45
3.3	Artigo 2 ** – Versão em Português – Avaliação do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças após a ingestão de sucos de laranja industrializados e refrigerante tipo cola: estudo <i>in vivo</i> .....	59
3.4	Artigo 2 ** – Versão em Inglês – Evaluation of pH, buffer capacity and amount of salivary calcium and phosphate in children after the ingestion of industrialized orange juices and cola soft drink: <i>in vivo</i> study .....	75
4	REFERÊNCIAS .....	90
5	ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos .....	97
6	ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	99

\* Artigo elaborado e formatado de acordo com as normas (2007)  
da Revista Caries Research.

\*\* Artigo elaborado e formatado de acordo com as normas (2007) do  
*International Journal of Paediatric Dentistry*

PATUSSI, E.G. **Ação de sucos de laranja e refrigerante sobre capacidade tampão, pH, cálcio e fosfato salivar de crianças – estudo *in vivo***. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análises bioquímicas na saliva de crianças, as modificações que ocorrem após a ingestão de bebidas com potencial erosivo distinto – dois sucos de laranja industrializados, com diferente capacidade tampão (CT), e um refrigerante tipo cola, bem como o tempo que o organismo leva para retomar seus padrões de normalidade. Participaram da pesquisa 34 escolares, com idade entre seis e oito anos, livres de cárie e de lesão erosiva. Os parâmetros salivares analisados foram o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato, antes e imediatamente após a ingestão das bebidas experimentais, e decorridos 5, 15 e 30 minutos. Quanto à CT salivar, 67,6% dos participantes apresentaram alta; 32,4%, moderada; e nenhum, baixa, valores positivamente correlacionados à saturação salivar de cálcio e de fosfato. As três bebidas provocaram queda significativa ( $p \leq 0,05$ ) no pH bucal, inicialmente neutro ( $7,26 \pm 0,04$ ), sendo que o suco com baixa CT reduziu para  $5,94 \pm 0,05$ , o com alta CT para  $5,70 \pm 0,05$ , e o refrigerante para  $5,14 \pm 0,05$ . Após 15 minutos, apenas a saliva exposta ao suco com alta CT não havia sido neutralizada significativamente, situação que ocorreu no tempo 30 minutos. A concentração média inicial de cálcio foi 1,12 mmol/L e de fosfato, 4,30 mmol/L. A ingestão das bebidas ácidas fez com que, inicialmente (tempo 1 min), ocorresse queda nesses valores salivares, seguida (tempo 5 min) de aumento, ultrapassando as concentrações iniciais. A saliva exposta ao suco de laranja com baixa CT foi a única que retornou ao equilíbrio original. Aos 15 minutos, a quantidade original de cálcio se regularizou e houve uma forte tendência ( $p=0,046$ ) da normalização da quantidade de fosfato que, na última coleta, já se mostrava equilibrado. Em relação ao refrigerante, 30 minutos não

foram suficientes para a saliva normalizar sua saturação de cálcio ( $p=0,029$ ); apenas a quantidade de fosfato se mostrou sem diferença significativa aos níveis originais ( $p=1$ ). Por fim, as amostras salivares expostas ao suco de laranja com alta CT, mesmo depois de 30 minutos, não voltaram à normalidade. Em função dos parâmetros analisados, observou-se que a alta capacidade tampão do suco foi responsável para que ocorresse a manutenção prolongada de um pH abaixo do neutro e quantidades de cálcio e de fosfato diferentes do original.

Palavras-chave: Erosão dentária; Saliva; pH; Capacidade tampão; Cálcio; Fosfato.

PATUSSI, E.G. **Ação de sucos de laranja e refrigerante sobre capacidade tampão, pH, cálcio e fosfato salivar de crianças – estudo *in vivo***. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, through chemical analysis of the children's saliva, the modifications that occur after ingesting beverages with distinct erosive potentials: two industrialized orange juices, with different buffer capacities and one cola soft drink; such as, the time the organism takes to recover its normal standard. Thirty-four schoolchildren, between the ages of six and eight years, with- caries and erosion-free dentition participated in the research. The salivary parameters analyzed were: pH, buffer capacity (BC) and the amounts of calcium and phosphate, before and immediately after ingesting the experimental beverages, and after 5, 15 and 30 minutes had elapsed. As regards salivary BC, 67% of the participants presented high; 33%, moderate; and no decrease; positive values correlated with salivary calcium and phosphate saturation. The three beverages caused significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in oral pH, initially neutral ( $7.26 \pm 0.04$ ): the juice with low BC reduced the pH to  $5.94 \pm 0.05$ ; the high BC juice, to  $5.70 \pm 0.05$ ; and the cola drink to  $5.14 \pm 0.05$ . After 15 minutes, only saliva exposed to the juice with high BC was not significantly neutralized, which also occurred after 30 minutes. The initial mean concentration of calcium was 1.12 mmol/L and phosphate, 4.30 mmol/L. Acid beverage ingestion initially (time 1 min) caused a decline in these salivary values, followed by an increase (time 5 min), surpassing the initial concentrations. The saliva exposed to orange juice with decreased BC was the only one that returned to its original equilibrium; at 15 minutes the original calcium amount had regulated, and had a strong tendency ( $p=0,046$ ) to normalize the phosphate amount, which at the last collection was shown to be equilibrated. As regards the cola drink, 30 minutes was not long enough for the saliva calcium saturation ( $p=0,029$ ) to normalize; only the

phosphate amount showed no significant difference to original levels ( $p=1$ ). Lastly, after 30 minutes, the salivary samples exposed to orange juice with high BC, did not return to normality. As a result of the analyzed parameters, it was observed that the high buffer capacity of juice was responsible for prolonged maintenance of reduced pH neutrality, and the difference in the amounts of calcium and phosphate when compared with the original values.

Keywords: Dental erosion; Saliva; pH; Buffer Capacity; Calcium; Phosphate.



“Caro “doutor”, trago meu filho aqui no seu consultório porque ele vive se queixando de dor nos dentes ao tomar bebidas geladas”. Esse relato pode ser de qualquer indivíduo, seja qual for sua idade, e salienta um fato que vem-se tornando constante nos últimos anos, a hipersensibilidade dentinária. Essa sintomatologia pode ser decorrente de lesões cariosas ou pulpares, ou ainda de restaurações insatisfatórias, como também decorrente de lesões que não têm envolvimento bacteriano e que provocam desgaste ou perda de estrutura dentária. Entre essas lesões, podem ser citados problemas gengivais, atrição, abrasão, abfração e, tema deste estudo, a erosão dentária (Abrahamsen, 2005; Addy, 2005).

A erosão dentária é definida como a perda ou a dissolução do tecido dentário devido à exposição constante a um meio ácido, sem o envolvimento bacteriano. Esse processo é lento, cumulativo e geralmente indolor, porém, com o aumento da profundidade da lesão, a sintomatologia dolorosa torna-se presente (Imfeld, 1996; Zero e Lussi, 2005).

Tem-se divulgado uma alta prevalência mundial desse problema, com uma média de 30% dos escolares apresentando, pelo menos, um dente com sinal erosivo (Jones e Nunn, 1995; Al-Malik, Holt, Bedi 2001, 2002; Harding et al., 2003; Peres et al., 2005; Wiegand et al., 2006). Entretanto, alguns estudos de prevalência não utilizam os mesmos critérios de diagnóstico e índices de mensuração, como também se observam divergências demográficas, socioeconômicas e culturais entre as populações avaliadas.

A formação das lesões erosivas é influenciada, de acordo com Lussi, Jaeggi e Zero (2004), por fatores químicos relacionados aos alimentos, por fatores comportamentais e por fatores relacionados ao próprio indivíduo (Tabela 1). Os ácidos responsáveis pelas lesões erosivas, podem advir do próprio organismo ou de fontes externas, sendo, por isso, classificados em intrínsecos e extrínsecos. Na maioria das vezes, os ácidos exógenos ao organismo resultam da alimentação, seja ela líquida ou sólida. As frutas cítricas e seus derivados, como sucos e refrigerantes, são os maiores responsáveis pela erosão dentária. Além disso, os ácidos podem ser decorrentes de medicamentos líquidos (Costa, Almeida, Costa-Filho, 2006) e até mesmo de anti-sépticos bucais (Pontefract et al., 2001).

Tabela 1 – Fatores que influenciam o potencial erosivo em relação aos alimentos e bebidas (LUSSI, JAEGGI e ZERO, 2004).

<i>Fatores Químicos</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ pH e capacidade tampão do produto</li><li>▪ Tipo do ácido</li><li>▪ Adesão do produto à superfície dentária</li><li>▪ Propriedades quelantes dos produtos</li><li>▪ Concentração de cálcio</li><li>▪ Concentração de fosfato</li><li>▪ Concentração de flúor</li></ul>
<i>Fatores comportamentais</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Maneira de comer e beber</li><li>▪ Estilo de vida saudável: alimentação rica em frutas ácidas e vegetais</li><li>▪ Consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas</li><li>▪ Mamadeira durante a madrugada contendo produtos ácidos</li><li>▪ Prática de higiene bucal</li><li>▪ Regurgitação / bulimia</li></ul>
<i>Fatores biológicos</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Saliva: fluxo, composição, capacidade tampão e capacidade de estímulo</li><li>▪ Película adquirida: espessura e propriedades difusoras</li><li>▪ Composição dentária e estrutura (por exemplo – conteúdo de fluoreto como fluorapatita ou como partículas de fluoreto de cálcio)</li><li>▪ Anatomia e oclusão dentária</li><li>▪ Anatomia dos tecidos moles circundantes aos dentes</li><li>▪ Movimentos fisiológicos dos tecidos moles</li></ul>

Quanto aos fatores intrínsecos, eles são originários comumente de distúrbios psicogênicos, tais como anorexia nervosa e bulimia, ou de desordens gastrintestinais. Isso ocorre tendo em vista o fato de o pH gástrico ser entre 1,0 a 1,5 e estar muito abaixo do nível crítico, de 5,5, para a dissolução do esmalte dental (Dynesén et al., 2004).

Quando um ácido entra em contato com a cavidade bucal, seja ele extrínseco ou intrínseco, ocorre uma queda no pH salivar, normalmente neutro. Isso faz com que a concentração de cálcio e de fosfato também baixe, deixando o meio subsaturado em relação aos tecidos minerais dos dentes (West et al., 1998). Para que ocorra o equilíbrio iônico, os dentes cedem minerais de sua estrutura para o meio bucal. O valor de pH, no qual os cristais de hidroxiapatita

começam a se dissolver, é conceituado como pH crítico para a desmineralização dentária. Nas crianças, em virtude da menor concentração de cálcio do que em adultos, uma menor diminuição no pH é suficiente para o esmalte começar a perder minerais. O pH crítico para crianças situa-se na faixa de 6,0 (Anderson, Hector e Rampersad, 2001).

Em tese, uma bebida com pH abaixo desse valor será capaz de causar erosão no esmalte dentário, mesmo que grande parte seja deglutida e pouco fique misturado com a saliva (O'Sullivan e Curzon, 2000). Apesar da acidez endógena ser responsável por essa queda no pH, a manutenção nessa condição é mais prejudicial – característica denominada capacidade tampão. Nesse sentido, uma bebida com capacidade tamponante mais elevada necessita de mais mineral para neutralizá-la, provocando maior efeito erosivo nos dentes. Dessa maneira, quando se estuda a erosão dentária, é importante verificar as propriedades das bebidas ingeridas, como também sua interação com o organismo (O'Sullivan e Curzon, 2000; Johansson et al., 2004).

Da mesma maneira, os tampões salivares atuam no sentido de manter o pH o mais próximo da neutralidade, competindo assim, com os tampões da bebida ou do ácido presente na cavidade bucal (Grenby et al 1989; Edwards, 1999; Zero e Lussi, 2005). Além dos tampões salivares, quanto maior o fluxo salivar, mais rapidamente ocorre a diluição das substâncias ingeridas e, conseqüentemente, menores são os efeitos do alimento sobre os dentes (Tenovuo, 1997).

Assim, o fluxo e a capacidade tampão da saliva são fatores que influenciam no desenvolvimento de lesões erosivas devido à eliminação e à neutralização dos ácidos presentes na cavidade bucal. Além dessas duas propriedades, a concentração de cálcio e de fosfato presentes na saliva pode indicar qual a saturação equilibrada individual e, após exposição aos ácidos, o quanto de mineral está ou foi dissolvido dos dentes (Zero e Lussi, 2005).

Em função do exposto, esta pesquisa teve o objetivo inicial determinar, em escolares de seis a oito anos, valores de referência para características e constituintes salivares, como pH, capacidade tampão, quantidade de cálcio e de fosfato. Em seguida, investigar como a saliva dessas crianças se comporta quando elas ingerem bebidas com diferentes potenciais erosivos. Para tanto, escolheram-se dois sucos de laranja, com valores de pH semelhantes e de

capacidades tampão diferentes, e um refrigerante tipo cola, e as mudanças salivares foram determinadas por análises bioquímicas, avaliando-se sua capacidade tampão, seu pH e a quantidade de cálcio e de fosfato presentes antes e após a ingestão das bebidas testadas.

Dos resultados obtidos, dois artigos foram criados: o primeiro sobre os valores de referência para os constituintes e as características da saliva em repouso; e o segundo sobre as conseqüências da ingestão de bebidas ácidas, sobre os mesmos constituintes e características salivares. Em conjunto com os dois artigos, esta tese traz, por primeiro, um capítulo com a metodologia completa, para que eventuais questionamentos possam ser resolvidos.

*Metodologia expandida*

Este estudo verificou, *in vivo*, os efeitos de dois sucos de laranja industrializados, com diferentes capacidades tampão (CT), de um refrigerante do tipo cola, e de uma água mineral sobre os constituintes salivares de 34 crianças. Para isso, coletaram-se amostras salivares antes e após a ingestão das bebidas, analisando-se o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato (Figura 1).

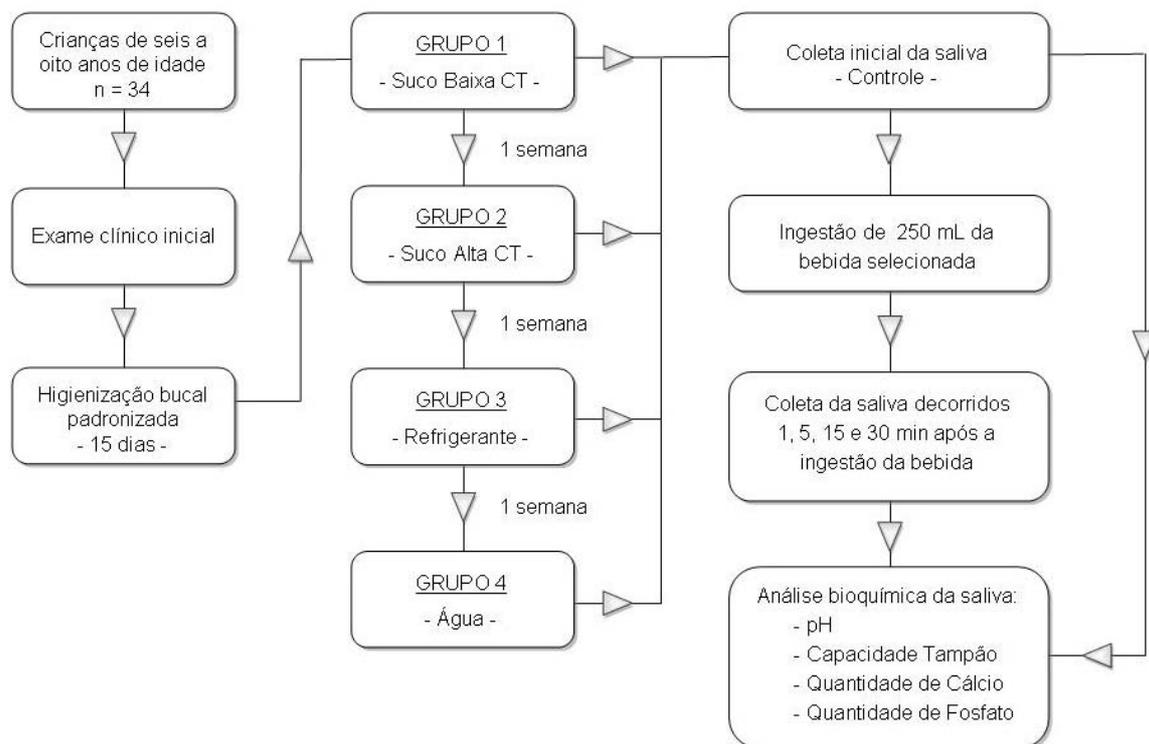


Figura 1. Delineamento experimental da pesquisa.

A metodologia foi dividida em seis itens:

- Aspectos éticos e legais
- Seleção dos participantes
- Seleção das bebidas utilizadas no experimento
- Ingestão das bebidas e coleta da saliva
- Análise bioquímica da saliva
- Análise estatística

## 1. Aspectos éticos e legais

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (Anexo 1). A participação da criança no estudo ficou condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) por seu responsável legal.

## 2. Seleção dos participantes

Participaram deste estudo crianças de seis a oito anos de idade, atendidas na clínica extramuro de Odontopediatria I e II da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF), situada na Escola Estadual Monteiro Lobato, na Vila Planaltina, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Foram convidadas todas as crianças, na faixa etária referida, que receberam alta do tratamento odontológico no período de 2004 a 2006, totalizando 119 crianças. Um único examinador verificou as condições bucais dessas crianças, selecionando apenas aquelas livres de lesões ativas nos dentes e nos tecidos moles. Observou-se, também, se elas já apresentavam dentes permanentes em boca, se residiam em região de abastecimento de água fluoretada e se estavam tomando algum tipo de medicamento contínuo. Nessa etapa, foram utilizados apenas abaixadores de língua descartáveis, secagem dos dentes com ar e iluminação direta. Em seguida, as que apresentavam lesões ativas foram encaminhadas para atendimento, sendo excluídas da seleção inicial, e as demais foram reavaliadas.

Daqueles 119 pacientes, foram selecionados 77, nos quais se fez profilaxia, isolamento relativo e uma análise minuciosa verificando-se a presença de lesões de cárie e de erosão, que os excluíam da pesquisa. Dessa maneira, foram selecionadas 56 crianças aptas a participar dos experimentos.

Após a seleção prévia, as crianças e seus responsáveis foram procurados, mediante uma reunião na Escola, e convidados a participar da pesquisa. Foram explicados todos os procedimentos a serem realizados, os objetivos, a metodologia, os riscos e os benefícios que teriam e, logo após, foi-lhes entregue,

individualmente, uma carta-convite e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), através do qual os pais poderiam consentir a participação do seu filho(a) na pesquisa.

Obtiveram-se 36 aceites, porém duas crianças não tinham condições de vir nos dias determinados para os experimentos, sendo então, excluídas da amostra. Com isso, o grupo amostral ficou constituído por 34 crianças (16 meninos e 18 meninas), todas com idade entre seis e oito anos.

### 3. Seleção das bebidas utilizadas no experimento

A seleção das duas marcas comerciais de suco de laranja foi feita a partir do estudo de Patussi (2003), considerando os seguintes critérios: ambos possuírem um pH ácido e semelhante entre si, e uma capacidade tampão com valores diferentes (estatisticamente significativa).

Os dois sucos selecionados apresentaram o pH em torno de 4,0 e uma capacidade tampão (CT) significativamente distinta:

- Ades<sup>®</sup> – pH 4,01 e CT 24,99\*
- Suvalan sem açúcar<sup>®</sup> – pH 3,96 e CT 102,16\*

\* CT: valor expresso em mililitro de solução de NaOH 0,1N para neutralizar 100ml de suco de laranja.

O refrigerante tipo cola selecionado foi a Coca-Cola<sup>®</sup>, e a água utilizada foi a Aquarel - Nestlé<sup>®</sup>. A figura 2 mostra as quatro bebidas adotadas nas etapas experimentais.

Terminada a seleção, realizou-se a análise bioquímica das referidas bebidas, avaliando-se o pH, a capacidade tampão da bebida e a quantidade de cálcio e de fosfato presentes na sua composição.

Para a dosagem do pH, foram pipetados 50 mL da bebida selecionada em um béquer de 250 mL, no qual foram adicionados 50 mL de água ultrapura (Milli-Q - Millipore<sup>®</sup>), obtendo-se uma diluição 1:1. A seguir, homogeneizou-se essa solução com bastão até que as partículas ficassem uniformemente suspensas e, em seguida, determinou-se o pH através de um pHmetro digital (DM-20 – Digimed), previamente calibrado com tampões 4,01 e 7,01 (Cairns et al, 2002).

Imediatamente foi avaliada a capacidade tampão (CT), através da adição de alíquotas de 0,1mL de NaOH 0,1N até que o pH atingisse 7,00. Calculou-se assim, a quantidade de base necessária para tamponar a bebida (Larsen e Nyvad, 1999).

A determinação da quantidade de cálcio e de fosfato presentes nas bebidas foi feita através de espectrofotometria, cuja metodologia foi a mesma para a análise desses íons na saliva, descritas no item “Análise bioquímica da saliva”.

Os resultados dessa análise estão descritos na tabela 1.



Figura 2. Bebidas adotadas nas etapas experimentais: - Suco de laranja com baixa CT (Ades<sup>®</sup>); Suco de laranja com alta CT (Suvalan sem açúcar<sup>®</sup>); Refrigerante tipo cola (Coca-Cola<sup>®</sup>); e Água natural (Aquarel - Nestlé<sup>®</sup>).

Tabela 1. Propriedades bioquímicas das bebidas utilizadas no experimento.

Bebida	pH	CT *	Cálcio **	Fosfato **
Suco de laranja com Baixa CT	3,95	27,63	1,35	3,99
Suco de laranja com Alta CT	3,83	105,32	1,16	3,55
Refrigerante tipo cola	2,41	25,01	0,26	6,99
Água	6,99	0,2	0,33	0

\* CT: valor expresso em mL de solução de NaOH 0,1N para neutralizar 100ml da bebida.

\*\* Cálcio e Fosfato: valor expresso em mmol/L

#### 4. Ingestão das bebidas e coleta da saliva

Antes de começar a ingestão das bebidas e a coleta salivar, as 34 crianças receberam um kit com uma escova dental (Escova Dental Panvel Macia 26 Tufos) e um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries – 90g).

Essa etapa teve início 15 dias antes do período de ingestão das bebidas. Os participantes foram orientados quanto à escovação dentária e recomendados a utilizarem somente a escova e o dentífrico fornecido durante todo o experimento, o qual era repostado caso terminasse. Além de padronizar a higienização bucal das crianças participantes, essa fase teve como objetivo reduzir a ansiedade das mesmas, que poderiam se mostrar preocupadas por fazerem parte de uma pesquisa.

Em relação à alimentação, todos os participantes foram instruídos a manter seus hábitos normais, porém não deveriam comer nem beber por 2 horas antes dos procedimentos. Os exames ocorreram no mesmo horário do dia, entre 10h e 10h30min, e as bebidas foram oferecidas com intervalos de uma semana entre cada ingestão.

Ao chegarem à clínica, as crianças recebiam cinco potes de polietileno, previamente desinfetados quimicamente (hipoclorito de sódio 1% e enxaguados com água destilada), com marcações correspondentes ao tempo de coleta salivar. Em seguida, sentavam de maneira que se sentissem confortáveis, e eram orientados a cuspir no pote com a marcação “inicial” (Azrak et al, 2003; Wiegand et al, 2006).

Após a coleta inicial da saliva, a bebida determinada para o dia era fornecida para as crianças, em copos plásticos graduados com 250 mL. As bebidas estavam geladas, com temperatura em torno de 10°C. Elas eram orientadas e ingerir normalmente e sem pressa, em até 2 minutos. Finalizado o consumo, a saliva era novamente coletada – 1, 5, 15 e 30 minutos após a ingestão.

As amostras salivares obtidas foram armazenadas em geladeira e, posteriormente, congeladas a uma temperatura de -20°C (freezer), para futura análise bioquímica. Cada amostra recebeu numeração específica e registro em planilha eletrônica, com o nome do participante, grupo e tempo da coleta. Em seguida, foram “cegadas” e aleatorizadas, exceto as amostras iniciais, que

serviam para verificar a capacidade tampão, de modo que o examinador não sabia qual amostra iria analisar.

## 5. Análise bioquímica da saliva

As amostras salivares foram descongeladas a temperatura ambiente, 12 horas antes do começo das análises. Os parâmetros salivares investigados foram o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato, descritos a seguir:

### 5.1 Determinação do pH salivar

Da amostra salivar descongelada, 200  $\mu$ L foram depositados em um béquer de 50 mL e diluídos 1:1 com água ultrapura (Milli-Q - Millipore®), aumentando assim o seu volume e facilitando a leitura do pH (Wiegand et al, 2006). Para esse procedimento, utilizou-se um pHmetro digital (DM-20 – Digimed) acoplado com um eletrodo de vidro, e os valores obtidos foram tabulados em uma planilha eletrônica.

O pHmetro utilizado possui um microprocessador capaz de identificar as mínimas variações de pH, com uma precisão de  $\pm 0,04$ . Ao início das leituras, o pHmetro foi calibrado com duas soluções tamponadas, uma com pH 4,01 e outra com pH 7,01. Entre as análises, eram feitas verificações com essas soluções padrões.

### 5.2 Determinação da capacidade tampão (CT)

A capacidade tampão da saliva foi determinada, tendo como guia o estudo de Bashir e Lagerlöf (1996), verificando-se a resistência à queda do pH da amostra salivar inicial (antes da ingestão das bebidas) após a adição de ácido cítrico.

Para essa análise, pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de saliva diluída em um béquer de 50 mL e adicionou-se uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico a 2% (pH 2,1). A mistura foi homogeneizada e esperaram-se 5 minutos até a leitura do pH. Verificou-se a capacidade tampão das quatro amostras iniciais de saliva de cada criança.

Por meio dos valores designados pelo Kit CRT Buffer Strip (Ivoclar / Vivadent), o qual estabelece que uma alta CT indica um pH  $\geq 6,00$ ; uma média CT, um pH entre 4,5 e 5,5; e uma baixa CT, um pH  $\leq 4,00$  (Arzak et al, 2003; Sánchez e Preliasco, 2003), foram padronizados três escores para a capacidade tampão:

- Alta CT – redução de até 25% do pH inicial
- Média CT – redução de 26 a 50% do pH inicial
- Baixa CT – redução de mais de 51% do pH inicial

Exemplificando, após a adição do ácido cítrico nas quatro amostras iniciais da saliva coletada de um paciente, o pH médio baixou de 7,1 para 5,5, representando uma redução de 23% do valor inicial. Assim, segundo os escores, apresenta uma alta CT, o que, em tese, faz com que essa criança tenha uma maior resistência às variações que o pH salivar sofre.

### 5.3 Determinação da quantidade de cálcio

A determinação quantitativa do cálcio presente em cada amostra salivar foi feita através de uma reação colorimétrica, utilizando-se o reagente Cálcio Arsenazo III (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda), e lida em um espectrofotômetro (Femto – 600).

O cálcio salivar reage com o Arsenazo III, formando um complexo de coloração azul / violeta, cuja intensidade é proporcional à concentração presente na amostra. Esse complexo é levado ao espectrofotômetro para ser lido (Attin et al, 2005; Wiegand et al, 2006).

O espectrofotômetro emite uma radiação eletromagnética (luz monocromática) de comprimento de onda variado, ajustado de acordo com a necessidade. Da intensidade inicial da radiação, parte sofre reflexão, parte é absorvida pelo meio e o restante é transmitido (Vogel, 2002).

Partindo desse princípio, o espectrofotômetro foi calibrado para a análise do cálcio presente na saliva. O comprimento de onda foi ajustado em 650nm. Em seguida, preparou-se uma solução (Branco) de 10 µL água ultrapura (Milli-Q - Millipore®) e 100 µL de cálcio Arsenazo III, para que se ajustasse a transmitância e absorbância do espectrofotômetro. A água ultrapura não possui cálcio, não absorvendo nenhuma parte da radiação, de modo que a transmitância foi regulada em 100%, e a absorbância em zero, ou seja, a intensidade inicial da radiação é a mesma da final.

Feito esse ajuste, preparou-se uma solução padrão de cálcio, com uma quantidade previamente estabelecida pelo fabricante do reagente, que servirá de base para a leitura das amostras salivares. Para isso, preparou-se uma solução (Padrão) com 10 µL do reagente padrão e 100 µL do reagente cálcio Arsenazo III.

A determinação da quantidade de cálcio depende da absorbância de cada amostra salivar. Nesse sentido, para a leitura, as amostras foram preparadas em tubos de ensaios, misturando-se 10 µL da saliva diluída anteriormente (1:1) com 100 µL do reagente cálcio Arsenazo III. Imediatamente, foram homogêneas e submetidas a um banho em água a 37°C por 2 minutos, estando prontas para análise.

Para a dosagem da quantidade de cálcio, seguiu-se a lei de Lambert-Beer (Vogel, 2002), utilizando-se o Fator de Calibração (FC) da amostra, de acordo com a fórmula abaixo, o qual servia de base para a quantificação do cálcio:

$$FC = \frac{10}{\text{absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \text{absorbância do teste} \times FC$$

$$\text{Cálcio (mmol/L)} = \frac{\text{absorbância do teste} \times FC}{4}$$

Todas as análises salivares foram feitas em duplicata, de modo que a quantidade de cálcio para a amostra da salivar era dada pela média aritmética. Além disso, o espectrofotômetro constantemente era verificado quanto à transmitância 100% e absorbância zero.

#### 5.4 Determinação da quantidade de fosfato

A determinação da quantidade de fosfato presente nas amostras salivares também foi feita pelo método colorimétrico e a leitura, no espectrofotômetro. Neste caso, para verificar a absorvância do fosfato, utilizaram-se outros reagentes, de acordo com o procedimento desenvolvido por Chan, Delfert e Junger (1986).

O reagente de cor foi obtido através da mistura de Verde Malaquita (2 partes) + Água ultrapura (2 partes) + Álcool Polivinílico (1 parte) + Molibdato de Amônio (1 parte). A solução foi homogeneizada por 30 minutos e, depois, armazenada em um frasco de cor âmbar, sob temperatura ambiente.

Estando pronto o reagente de cor, o próximo passo foi preparar o Branco (solução livre de fosfato) e o Padrão (com dosagem pré-determinada). O Branco foi obtido através da mistura de 1 mL do reagente de cor + 200µL de água ultrapura + 200µL de TCA 10% (ácido triclorocético). Esta solução está livre de fosfato, servindo então para ajustar a transmitância do espectrofotômetro em 100%, ou seja, a luz incidente não é absorvida pelo líquido. Para a determinação do fosfato, o comprimento de onda empregado foi de 630 nm.

Em seguida, foram preparadas quatro soluções livres de fosfato (Branco), nas quais se adicionaram 10, 15, 20 e 25 µL da solução padrão de fosfato inorgânico 400 nM. Com isso, obtiveram-se quatro Padrões distintos de fosfato, com diferentes concentrações: 4, 6, 8 e 10 nM, respectivamente.

Uma vez calibrado o espectrofotômetro e preparados os Padrões e o Branco, calculou-se o Fator de Calibração, que, nesse caso, foi determinado a partir da média dos quatro Fatores Parciais, gerados pela leitura das absorvâncias dos Padrões de fosfato:

- Fator Parcial 1 =  $4 \div \text{Absorvância do Padrão 1}$
- Fator Parcial 2 =  $6 \div \text{Absorvância do Padrão 2}$
- Fator Parcial 3 =  $8 \div \text{Absorvância do Padrão 3}$
- Fator Parcial 4 =  $10 \div \text{Absorvância do Padrão 4}$
- Fator de Calibração:  $(F1 + F2 + F3 + F4) \div 4$

Seguindo as leis da colorimetria e da espectroscopia, a intensidade de energia eletromagnética que atravessa o meio diminui exponencialmente de acordo com a sua concentração iônica. Dessa maneira, quanto mais concentrada de fosfato estiver a amostra, maior será sua absorbância (Vogel, 2002).

Para a leitura do fosfato, foi necessário novamente preparar a amostra salivar, em duplicata, transferindo-se para um béquer 100  $\mu$ L da saliva diluída (1:1) e adicionando-se 100  $\mu$ L de água ultrapura e 1 mL do reagente de cor. Essa mistura foi homogeneizada por 20 minutos para, posteriormente, poder ser lida no espectrofotômetro.

Para a quantificação do fosfato salivar, seguiu-se, outra vez, a Lei de Lambert-Beer, na qual o valor da absorbância da amostra foi multiplicado pelo Fator de Calibração.

## 6. Análise estatística

Para a análise das amostras salivares, tanto antes quanto após as exposições às bebidas, foram utilizados modelos mistos (tipo de ANOVA) com o software SAS 8.02 (SAS System Inc.; Cary, NC, USA). Levou-se em consideração a interdependência entre as observações, ou seja, os valores individuais conforme a bebida ingerida, bem como as variações médias do grupo, aleatorizando os indivíduos e utilizando um intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). A estrutura de covariância utilizada foi a Componentes de Variância e o método de estimação de diferenças entre os grupos foi o Tukey-Kramer.

As variáveis dependentes foram o pH, a Capacidade Tampão (CT), a quantidade de Cálcio e de Fosfato, e os efeitos fixos (variáveis explicativas) foram o tempo da coleta da saliva e a bebida ingerida, para cada indivíduo e para o grupo todo.



---

## Avaliação do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças

---

Patussi EG<sup>1</sup>, Almeida ICS<sup>2</sup>, Costa Filho LC<sup>3</sup>, Costa CC<sup>4</sup>

1. Mestre e aluno do Doutorado em Odontologia da UFSC, área de concentração Odontopediatria. Professor das disciplinas Odontopediatria I, II e III da FOUFP.
2. Doutora em Odontopediatria pela USP-Bauru. Professora das disciplinas Odontopediatria I e II da UFSC. Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC.
3. Doutor em Medicina pela UFRG. Professor da FOPUC-RS
4. Doutora em Odontologia pela UFSC, área de concentração Odontopediatria.

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar, em escolares de seis a oito anos, valores de referência para características e constituintes salivares, como pH, capacidade tampão, quantidade de cálcio e de fosfato. Participaram da pesquisa 34 crianças, 18 meninas e 16 meninos, livres de cárie e de lesão erosiva, com higiene bucal satisfatória e residentes em região com água de abastecimento fluoretada. O pH foi determinado por pHmetro digital; a capacidade tampão por meio de titulometria; e a quantidade de cálcio e de fosfato com a utilização de métodos colorimétricos. Analisaram-se quatro amostras salivares de cada criança, com intervalo de uma semana entre as coletas. De acordo com os resultados obtidos, não se observou diferença significativa entre as amostras salivares do mesmo participante, nem entre meninos e meninas. Por isso, utilizou-se a média das quatro análises individuais para as comparações entre os participantes. Observaram-se um pH médio de 7,25 e uma média de 1,12 mmol/L e 4,3 mmol/L de cálcio e de fosfato, respectivamente. Apenas a capacidade tampão mostrou variação significativa ( $p=0,038$ ), sendo que 67% das crianças apresentaram alta; 33%, moderada; e nenhuma, baixa. Verificaram-se forte correlação entre cálcio e fosfato, bem como interação positiva dessas variáveis

com os valores de capacidade tampão. Os parâmetros analisados sugerem que as análises destes fatores salivares são importantes para a predição da maior suscetibilidade individual para o desenvolvimento de lesões de cárie e erosão, quando exposto aos fatores de risco.

Palavras-chave: Erosão dentária; Saliva; pH; Capacidade tampão; Cálcio; Fosfato.

## INTRODUÇÃO

A saliva total é considerada a mistura dos fluidos secretados pelas glândulas salivares (saliva pura) com outras secreções e líquidos presentes na cavidade bucal, oriundos do sulco gengival e da descamação das células epiteliais, além de microorganismos da placa bacteriana e de restos alimentares que ficam aderidos às superfícies dentárias. Em indivíduos saudáveis, a produção salivar varia de 0,5 a 1,5 litro por dia, sendo composta por 99% de água e menos de 1% de componentes inorgânicos e orgânicos, principalmente proteínas e sais [Sreebny, 2000; Pedersen et al., 2002].

A saliva é fundamental para a manutenção do equilíbrio da saúde bucal. Tal equilíbrio se baseia em características como fluxo e capacidade tampão, e por componentes como cálcio e fosfato, que auxiliam nos processos remineralizadores dos dentes [Zero e Lussi, 2005].

O fluxo salivar é responsável pela diluição e remoção de substâncias da cavidade bucal, além de proporcionar a deglutição ou a expectoração. Atua na eliminação de açúcares como também de ácidos alimentares, contribuindo para a prevenção de lesões de cárie e de erosão dentária [Tenovuo, 1997].

Outro benefício da saliva é o tamponamento dos ácidos presentes na cavidade bucal. Essa característica mantém o pH neutro e equilibra os processos de desmineralização e de remineralização dentária [Bardow et al., 2001]. Quando alguma fonte ácida entra em contato com a cavidade bucal, ocorre uma queda no pH e na concentração de cálcio e de fosfato salivar, deixando o meio subsaturado desses íons em relação aos dentes. A reposição dos mesmos

ocorre através de trocas iônicas, o que ocasiona a dissolução dos cristais de hidroxiapatita [Larsen e Nyvad, 1999]. O valor do pH no qual os cristais começam a se dissolver, é conceituado como pH crítico, que, nas crianças, em virtude da menor concentração de cálcio salivar, encontra-se na faixa de 6,0, enquanto, em adultos, o conteúdo mineral dentário começa a se perder a partir de 5,5 [Anderson e al., 2001].

Da saliva produzida, parte fica aderida às superfícies dentárias. O resultado é um biofilme constituído por proteínas e por outras macromoléculas, denominado película adquirida. Essa película, devido à sua natureza permeável, permite a difusão e o transporte iônico de cálcio e de fosfato, para dentro e para fora do esmalte dentário, protegendo sua superfície contra a destruição erosiva e cariogênica. A qualidade e a quantidade dessa película determinam seu potencial protetor [Hannig e Balz, 2001].

Quando o equilíbrio dessas funções e características salivares é rompido, uma das lesões que podem acometer os dentes é a erosão, definida como a dissolução do tecido mineralizado dos dentes expostos a um meio constantemente ácido. Esses ácidos podem advir do próprio organismo, nos casos de bulimia ou de regurgitação, ou de fontes exógenas, como os alimentos e as bebidas. Esse processo é cumulativo e progressivo, ocasionando perda substancial da estrutura dentária e, conseqüentemente, sensibilidade dolorosa [Imfeld, 1996].

A formação das lesões erosivas é influenciada, de acordo com Lussi et al. [2004], por fatores químicos relacionados aos alimentos (tipo do ácido, pH e capacidade tampão, efeito quelante, concentração de cálcio e fosfato); por fatores comportamentais (frequência e modo de consumo dos alimentos e bebidas ácidas); e por fatores relacionados ao próprio indivíduo, no caso, características e propriedades de sua saliva.

Visto que a saliva representa uma proteção para a saúde e os dentes, salienta-se a importância de estudo que traga maior detalhamento sobre características salivares de crianças, população exposta aos perigos da perda de estrutura dental devido ao aumento do consumo de líquidos ácidos. O objetivo deste estudo foi determinar, em escolares de seis a oito anos, valores de referência para constituintes salivares, como cálcio e fosfato, como também pH e capacidade tampão.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas, por um único examinador, 34 crianças, de seis a oito anos de idade (16 meninos e 18 meninas) após profilaxia, isolamento relativo e que apresentassem as seguintes características: dentição mista, livres de lesões nos dentes e nos tecidos moles, residentes em região com água de abastecimento fluoretada e que não estivessem tomando medicamentos de uso contínuo.

As crianças selecionadas eram atendidas na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (RS), Rio Grande do Sul, Brasil, e receberam alta do tratamento odontológico no período de 2004 a 2006, estando no controle, apenas com atividades preventivas. A participação das crianças na pesquisa ficou condicionada à assinatura, por seu responsável legal, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado, juntamente com o projeto de pesquisa, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (registro no CEP 217/2006).

Em um primeiro momento, os participantes receberam um kit com uma escova dental (macia, 26 tufos) e um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries – 90g) 15 dias antes do início das coletas salivares. Foram orientados quanto à técnica de escovação e recomendados a utilizar somente a escova e o dentífrico fornecidos, instruídos a manter seus hábitos alimentares, porém não deveriam comer nem beber por 2 horas antes da coleta, que ocorreu entre 10h e 10h30min.

Ao chegarem à clínica, as crianças recebiam um pote de polietileno desinfetado com hipoclorito de sódio 1% e, em um intervalo de 2 minutos, eram orientadas a cuspir dentro do mesmo [Azrak et al, 2003; Wiegand et al, 2006]. Para cada criança foram feitas quatro coletas de saliva, com intervalo de uma semana entre cada uma delas, sempre no mesmo horário e seguindo-se os mesmos cuidados prévios.

As amostras salivares foram numeradas e registradas em planilha eletrônica, com o nome do participante e data, e armazenadas em geladeira, sendo, posteriormente, congeladas a uma temperatura de -20°C (freezer), para análise do pH, da capacidade tampão e da quantidade de cálcio e de fosfato.

#### a) pH salivar

Para determinação do pH salivar, depositaram-se 200 µL da saliva coletada em um béquer de 50 mL, diluindo-a 1:1 com água ultrapura (Milli-Q - Millipore®). O pHmetro utilizado (DM-20 – Digimed®) foi calibrado com duas soluções padrões (pH 4,0 e 7,0), identificando-se as variações do pH com uma precisão de  $\pm 0,04$  [Wiegand et al, 2006].

#### b) Capacidade tampão (CT)

A capacidade tampão salivar foi determinada pela adição de 25 µL de ácido cítrico 2% (pH 2,1) nas amostras da saliva, e observação da redução do pH [Bashir e Lagerlöf, 1996]. Dessa maneira, três escores foram adotados [Arzak et al, 2003; Sánchez e Preliasco, 2003]:

- Alta CT – redução de até 25% do pH inicial
- Média CT – redução de 26 a 50% do pH inicial
- Baixa CT – redução de mais de 51% do pH inicial

#### c) Quantidade de cálcio

O cálcio foi determinado através de uma reação colorimétrica, a partir da utilização do reagente Cálcio Arsenazo III (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda). As amostras salivares foram preparadas misturando-se 10 µL da saliva diluída (1:1) com 100 µL do reagente de cor. O cálcio salivar reage com o Arsenazo III, formando um complexo de coloração azul / violeta, cuja intensidade é proporcional à concentração presente na amostra. Esse complexo foi homogeneizado e submetido a um banho em água a 37°C por 2 minutos e, em seguida, levado ao espectrofotômetro, onde foi analisado com um comprimento de onda de 650nm. Todas as análises salivares foram feitas em duplicata, de modo que a quantidade de cálcio era determinada pela média aritmética [Attin et al, 2005b; Wiegand et al, 2006].

#### d) Quantidade de fosfato

A determinação da quantidade de fosfato também foi feita pelo método colorimétrico, utilizando-se o reagente de cor obtido através da mistura de Verde Malaquita (2 partes) + Água ultrapura (2 partes) + Álcool Polivinílico (1 parte) + Molibdato de Amônio (1 parte). Foram pipetados em um béquer 100 µL da saliva

diluída (1:1), na qual foram adicionados 100 µL de água ultrapura e 1 mL do reagente de cor. Essa mistura foi homogeneizada por 20 minutos e, posteriormente, lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 630nm Chan et al. [1986].

#### e) Análise estatística

As amostras salivares foram analisadas por meio de modelos mistos (tipo de ANOVA) com o software SAS 8.02 (SAS System Inc.; Cary, NC, USA). Levaram-se em consideração as variações médias individuais e entre o grupo, utilizando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). As variáveis dependentes foram o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato. Os efeitos fixos (variáveis explicativas) foram a data da coleta da saliva, para cada indivíduo e para o grupo todo. A estrutura de covariância utilizada foi a Componentes de Variância, e o método de estimação de diferenças foi o Tukey-Kramer.

## RESULTADOS

Dos parâmetros salivares analisados, não se observou diferença estatisticamente significativa entre meninos e meninas, bem como entre as quatro análises feitas inicialmente para cada criança, de modo que os valores do pH, capacidade tampão, cálcio e fosfato foram descritos pela média das amostras (Tabela 1).

Em relação às variáveis pH, cálcio e fosfato, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os 34 participantes (Figura 1, 2 e 3). No entanto, na análise da capacidade tampão salivar, observou-se que as crianças apresentaram valores significativamente diferentes entre si ( $p=0,038$ ). Quanto à distribuição categórica, 67,6% dos participantes apresentaram uma alta capacidade tampão (redução de até 25%), seguidos de 32,4% com moderada (redução de 26 a 50%). Nenhuma criança apresentou capacidade tampão baixa (Figura 4).

Tabela 1. Valores médios (n 34), máximo e mínimo, desvio padrão, erro padrão e intervalo de confiança (p) das variáveis analisadas na saliva.

	Média	Max	Min	Desvio Padrão	Erro Padrão	P
pH	7,257	7,86	6,82	0,273	0,047	0,435
Capacidade Tampão*	23,933	33,5	16,25	5,02	0,861	0,038
Cálcio (mmol/L)	1,120	1,59	0,72	0,205	0,035	0,678
Fosfato (mmol/L)	4,297	6,10	2,70	0,815	0,139	0,737

\* Porcentagem de redução do pH inicial após adição de ácido cítrico a 2% (pH 2,1).

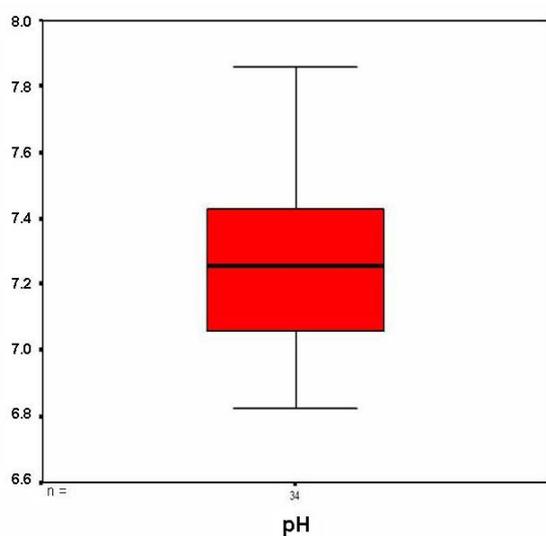


Figura 1. Gráfico bloxplot do pH.

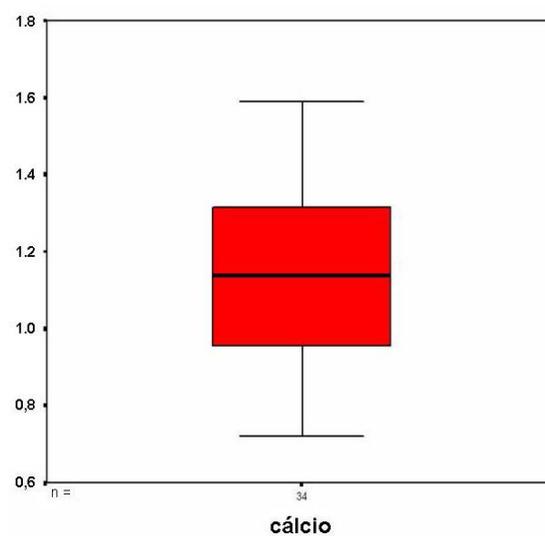


Figura 2. Gráfico bloxplot do cálcio.

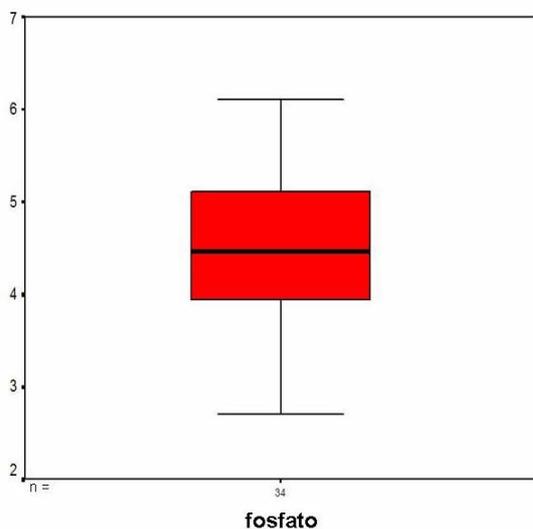


Figura 3. Gráfico bloxplot do fosfato.

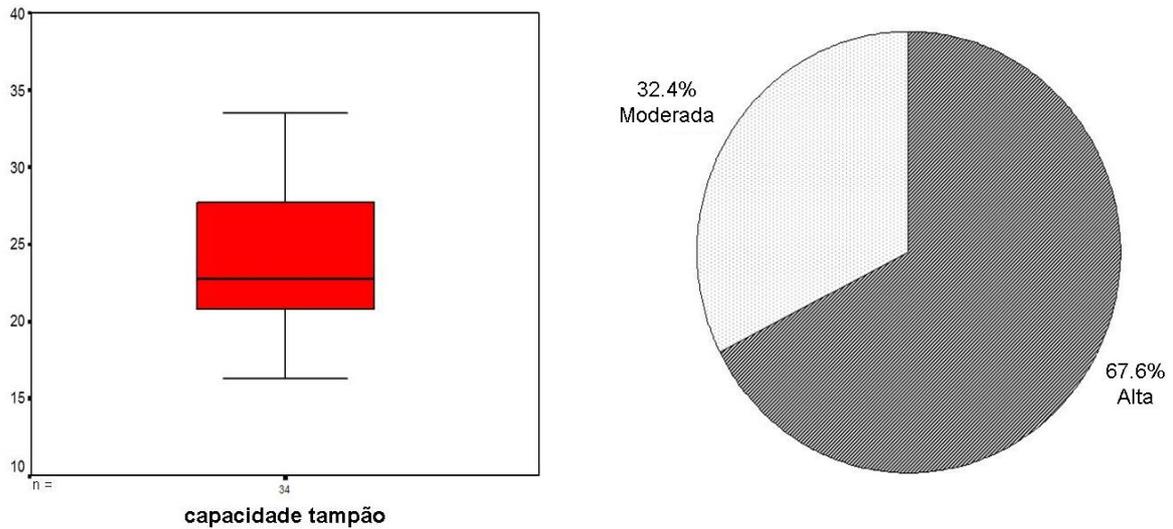


Figura 4. Gráfico Bloxplot e distribuição categórica da capacidade tampão.

Em relação à interdependência entre variáveis (correlação de Pearson), observou-se uma forte correlação entre cálcio e fósforo, bem como uma interação positiva dessas variáveis com os valores de capacidade tampão. Em relação ao pH, não houve correlação significativa com as outras variáveis (Figura 5, 6 e 7).

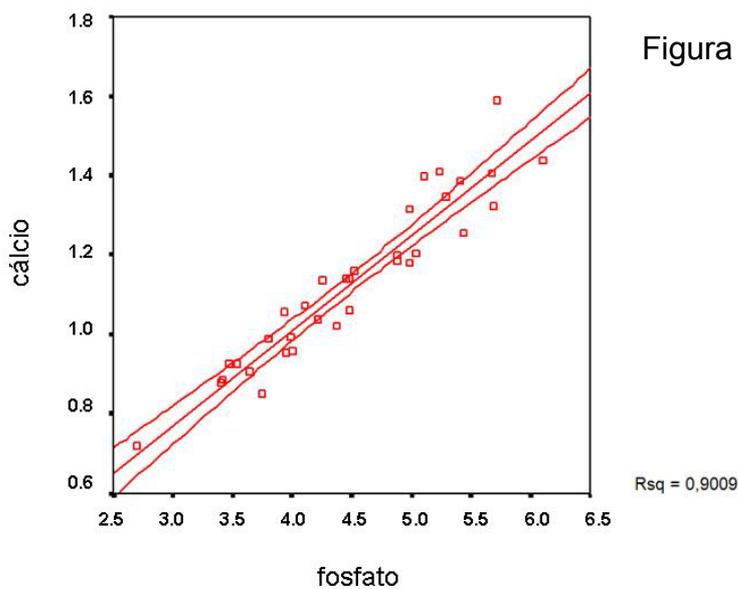


Figura 5. Correlação positiva entre cálcio e fósforo

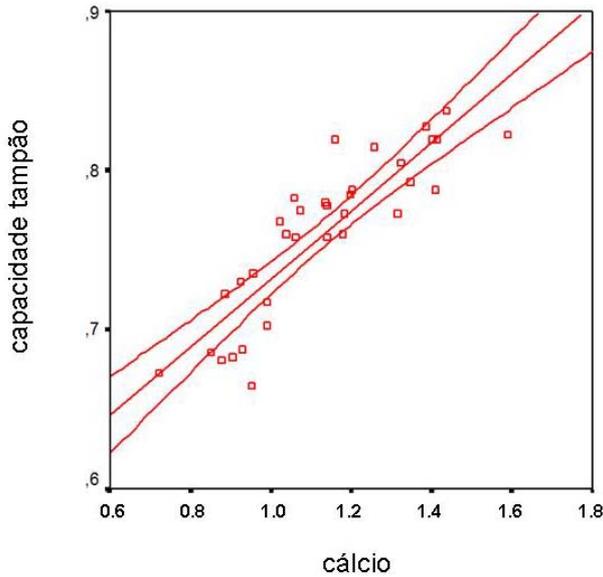


Figura 6. Correlação positiva entre capacidade tampão e cálcio

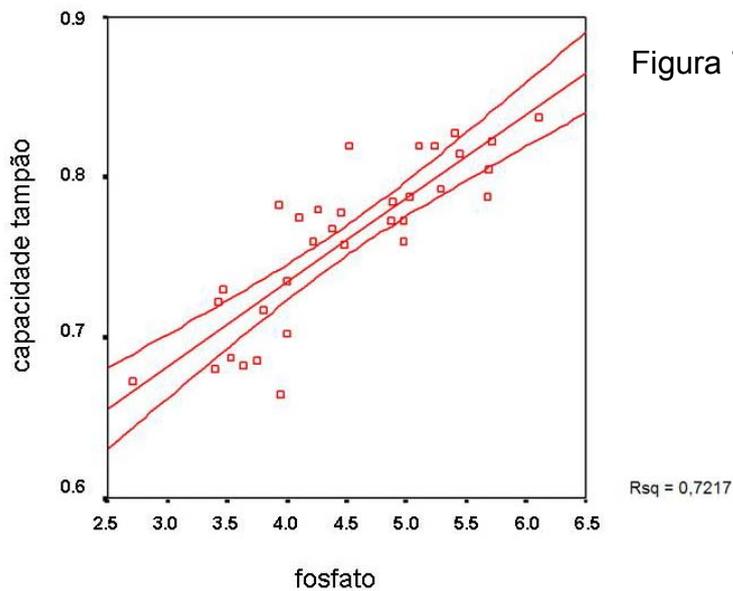


Figura 7. Correlação positiva entre capacidade tampão e fosfato

## DISCUSSÃO

A saliva varia em quantidade e em qualidade, diferindo na sua estrutura, composição e espessura, dependendo da glândula que a produz. É importante para proteção dos dentes e das mucosas bucais, através de seus constituintes e de suas características [Carey e Vogel, 2000; Hannig e Balz, 2001].

O fluxo e a capacidade tampão da saliva estão entre as características mais importantes, pois através deles os ácidos oriundos do metabolismo bacteriano ou dos alimentos são neutralizados e eliminados da cavidade bucal.

Essas duas características, combinadas com pH e concentração de cálcio e de fosfato, sofrem fortes flutuações individuais, variando conforme o momento e o dia do exame [Larsen e Nyvad, 1999, Zero e Lussi, 2005].

Nesta pesquisa, os 34 participantes não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) entre as quatro amostras de saliva, coletadas com uma semana de intervalo, como também não se observou diferença entre as crianças que participaram do estudo quando considerados valores médios de pH, cálcio e fosfato, exceto para valores da capacidade tampão, que mostrou uma pequena variação ( $p=0,038$ ). Isso ocorreu, possivelmente, devido aos critérios de inclusão das crianças no grupo amostral, bem como a similaridade entre os participantes, além da rotina pré-estabelecida em todas as etapas dos exames salivares.

A variação fisiológica do pH salivar não-estimulado concentra-se na faixa de 6,5 a 7,5. Contudo, esse valor representa o estado momentâneo da cavidade bucal durante a coleta, sendo que é mais importante a sua manutenção próximo da neutralidade, função desempenhada principalmente pelos tampões salivares [Bashir e Lagerlöf, 1996; Jensdottir et al., 2005]. Indivíduos com um pH em repouso, na faixa de 7,0, normalmente apresentam pouca ou nenhuma atividade de cárie ou erosão [Hicks, Garcia-Godoy e Flaitz, 2003]. Nesta pesquisa, observou-se um pH médio de 7,25, com variação de 6,8 a 7,8, semelhante ao encontrado em estudos envolvendo crianças na mesma faixa etária [O'Sullivan e Curzon, 2000a; Anderson et al., 2001; Azrak et al., 2003; Sánchez e Preliasco, 2003].

Quanto à capacidade tampão, todas as crianças avaliadas apresentavam-na de moderada a alta, nenhuma baixa, com valores correspondentes aos apontados por Sánchez e Preliasco [2003]. De acordo com O'Sullivan e Curzon [2000a], a capacidade tampão é influenciada diretamente pela quantidade de cálcio e de fosfato presentes nos fluidos bucais. Esse mesmo fato também fora observado nesta pesquisa, que apontou forte correlação positiva entre a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato presentes nas amostras examinadas.

A quantidade de cálcio encontrada variou de 1,59 a 0,72, com uma média de 1,12 mmol/L. Quanto ao fosfato, a variação foi maior, de 6,10 a 2,70, com uma média de 4,29 mmol/L. Mesmo apresentando variações entre as amostras

coletadas, não foram observadas diferenças significativas entre os participantes ( $p=0,678$  e  $0,737$ , respectivamente para cálcio e fosfato). Esses valores são semelhantes aos encontrados por Anderson et al. [2001] e Wiegand et al. [2006], que também avaliaram a saliva de crianças. Os primeiros autores encontraram ainda diferença entre a quantidade de cálcio salivar de crianças e adultos, os quais apresentaram valores significativamente maiores. Por essa razão, justificam que o pH crítico para a desmineralização dentária das crianças seja mais elevado e, conseqüentemente, uma pequena variação no pH bucal é suficiente para que os cristais de hidroxiapatita comecem a dissolver. Como valores de referência, crianças com um pH salivar abaixo de 6,5, somado à baixa capacidade tampão, apresentam risco de erosão dentária consideravelmente maior do que os adultos, cujo pH crítico concentra-se na faixa de 5,5 [O'Sullivan e Curzon, 2000a, 2000b; Johansson et al., 2001].

Após a desmineralização dentária, decorrente de um desafio erosivo, a saliva apresenta um papel reparativo, sendo que a capacidade tampão, nesse caso, é mais importante que o fluxo salivar. Quando os ácidos são neutralizados ou eliminados da superfície dentária, a deposição de cálcio e de fosfato salivares induz à remineralização dos tecidos desmineralizados, preenchendo os defeitos microscópicos [Hannig e Balz, 2001]. Além disso, o cálcio presente na saliva e na película adquirida também desempenha papel importante na incorporação e na retenção do flúor [Eisenburger et al., 2001; Ganss et al., 2001; Whitford et al., 2002].

Como os dentes decíduos apresentam uma camada de esmalte mais delgada e amplas câmeras pulpares, a evolução das lesões erosivas pode rapidamente induzir hipersensibilidade dentinária ou comprometimento pulpar, muitas vezes, destruindo os dentes e até mesmo originando perdas precoces (Shaw e O'Sullivan, 2000; Ganss, Klimed e Giese, 2001).

A ingestão de alguns alimentos pode influenciar as funções salivares, por exemplo, o ácido cítrico, encontrado em muitos sucos de frutas e refrigerantes, é um poderoso estimulante gustatório, o que facilita sua eliminação das superfícies dentárias; em compensação, possui efeito quelante, atraindo cálcio e reduzindo o efeito tampão da saliva [Lussi e Schaffner, 2000; Eisenburger et al., 2001]. Em contrapartida, alimentos ricos em cálcio e em fosfato auxiliam na proteção aos dentes, minimizando a formação de lesões erosivas, como é o caso dosiogurtes,

que, mesmo com um pH baixo ( $\pm 4,0$ ), ainda apresentam efeito erosivo praticamente inexistente, devido ao seu alto conteúdo de cálcio e de fosfato [Attin et al., 2005].

Diante do exposto, exames salivares têm-se tornado úteis na previsibilidade e no diagnóstico de lesões como erosão e cárie, principalmente por não serem invasivos e serem capazes de apontar mudanças nos padrões normais dos componentes salivares. A análise da composição química pode ser influenciada por variações fisiológicas como idade, alimentação, circunstâncias com que a saliva foi coletada, de modo que é necessária a minimização dos estímulos externos. E, em função dos parâmetros analisados, considera-se que as principais análises a serem feitas na saliva envolvem a determinação de sua capacidade tampão e da quantidade de cálcio, que influenciam diretamente o desenvolvimento das lesões erosivas.

## CONCLUSÕES

- O grupo de crianças estudadas apresentou valores de pH salivar neutro;
- A capacidade tampão da saliva foi classificada como alta em 67,6% e moderada em 32,4% dos participantes;
- Houve correlação positiva entre as quantidades de cálcio e de fosfato entre si e entre cada um desses íons e a capacidade tampão;
- Os parâmetros analisados sugerem que as análises desses fatores salivares são importantes para a predição da maior suscetibilidade individual para o desenvolvimento de lesões de erosão, quando exposto aos fatores de risco.

## REFERÊNCIAS

Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paed Den* 2001; 11: 266-273.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Diseases*, 2005; 11:7-12.

Attin T, Becker K, Hannig C et al. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005; 39: 432-436.

- Azrak B, Callaway A, Knözinger S, et al. Reduction of the pH-values of whole saliva after the intake of apple juice containing beverages in children and adults. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1:229-236.
- Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relations between medications intake, complaints of dry mouth, saliva flow rate, saliva composition and the rate of human tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* 2001; 46:413-423.
- Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B et al. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. *Caries Res* 2003; 37: 232-236.
- Bashir E, Lagerlöf F. Effect of citric acid clearance on the saturation with respect to hydroxiapatita in saliva. *Caries Res* 1996; 30: 213-217.
- Carey CM, Vogel GL. Measurement of calcium activity in oral fluids by ion selective electrode: method evaluation and simplified calculation of ion activity products. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 2000; 105: 267-273.
- Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-380.
- Eisenburger M, Addy M, Hughes JA et al. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35: 211-215.
- Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents – a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2001; 29: 264-271.
- Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures of erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001; 35:325-330.
- Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001; 35: 142-148.
- Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralisation (part 1). *J Clin Paed Dent* 2003; 28:47-52.
- Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-155.
- Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries Res* 2005; 39: 468-474.
- Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth – an in vivo and in vitro study. *J Dent* 2001; 29: 333-340.
- Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81-87.
- Lussi A; Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000; 34: 182-187.
- Lussi A; Jaeggi T; Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 34-44.
- O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000a; 34: 82-87.
- O'Sullivan EA, Curzon MEJ. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000b; 67: 186-192.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases* 2002; 8:117-129.

Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 251-257.

Shaw L, O'Sullivan E. Diagnosis and prevention of dental erosion in children. *Int J Paediatr Dent*, 2000; 10: 356-365.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000; 50:140-161.

Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 82-86.

Vogel A. *Análise Química Quantitativa*. 6ª Ed. LTC 2002; Cap.17: 351-385.

Wiegand A, Müller J, Werner C et al. Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German Kindergarten Children. *Oral Diseases* 2006; 12: 117-124.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent of plaque calcium concentrations. *Caries Res*, 2002; 36: 256-265.

Zero DT, Lussi A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.



---

## Evaluation of pH, buffer capacity and amount of salivary calcium and phosphate in children

---

Patussi EG<sup>1</sup>, Costa Filho LC<sup>2</sup>, Almeida ICS<sup>3</sup>, Costa CC<sup>4</sup>

1. Dr Patussi is professor of the disciplines of Pediatric Dentistry I, II and III of the University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.
2. Dr Costa Filho is professor of the Clinical Department, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Dr Almeida is professor, Post Graduation Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.
4. Dr Costa is captain and general dentist in the Military Police Force of the state of Rio Grande do Sul (Brigada Militar), Santa Maria, RS, Brazil.

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine reference values, in 6 to 8 year-old schoolchildren, for salivary characteristics and constituents, such as pH, buffer capacity, amounts of calcium and phosphate. The sample consisted of thirty-four children, 18 girls and 16 boys, free of caries and erosion, with good oral hygiene and residents in a region with fluoridated water. The pH was determined by pHmeter, buffer capacity by titration, and the amount of calcium and phosphate by colorimetric methods. Four saliva samples from each child were analyzed with 1 week interval between collections. There was no statistically significant difference among the saliva samples, either from the same child or between boys and girls. The mean of the 4 individual analyses of each child was used for comparisons among the children. A mean pH of 7.25 was observed and the mean values for calcium and phosphate were 1.12mmol/L and 4.3mmol/L, respectively. Buffer capacity showed significant variation ( $p=0.038$ ), as 67% of the children presented high buffer capacity and 33%, a moderate level. A strong correlation was verified between calcium and phosphate and a positive interaction of these variables with buffer capacity values. The evaluated parameters suggested that analysis of these salivary factors is important for predicting higher individual

susceptibility to developing caries and erosion lesions when children are exposed to risk factors.

Key words: dental erosion, saliva, pH, buffer capacity, calcium, phosphate

## INTRODUCTION

The total saliva is considered a mixture of fluids secreted by salivary glands (pure saliva) and other secretions and liquids present in the oral cavity, originating from the gingival sulcus and epithelial cell desquamation, in addition to microorganisms from bacterial plaque and food debris adhered to dental surfaces. In healthy individuals, saliva production varies from 0.5 to 1.5 liters per day and is composed of 99% of water and less than 1% of organic components, mainly proteins and salts [Sreebny, 2000; Pedersen et al., 2002].

Saliva is fundamental to the maintenance of balanced oral health. This equilibrium is based on characteristics, such as salivary flow and buffer capacity, and on components, such as calcium and phosphate, which assist the tooth remineralization process [Zero and Lussi, 2005].

Salivary flow is responsible for diluting and removing substances from the oral cavity and also promotes deglutition and expectoration. It acts to eliminate sugar and remove food acids that contribute to dental caries, and to prevent erosion [Tenovuo, 1997].

Another benefit of saliva is its effect of buffering acids present in the oral cavity. This characteristic maintains the neutral pH and balances dental de-mineralization process [Bardow et al., 2001]. When an acid source comes into contact with the oral cavity, there is a drop in pH and in salivary calcium and phosphate concentration, which sub-saturates the environment with these ions in relation to teeth. Ion replacement occurs through ionic changes that cause hydroxyapatite crystal dissolution [Larsen and Nyvad, 1999]. The pH value at which crystals began to dissolve is called the critical pH, which is around 6.0 in children, due to the lower concentration of salivary calcium; whereas in adults, the dental mineral component dissolution begins at 5.5 [Anderson e al., 2001].

Of the saliva produced, part of it remains adhered to dental surfaces. The result is a biofilm constituted of proteins and other macromolecules, known as acquired pellicle. Due to its permeable nature, this pellicle allows ionic diffusion and calcium and phosphate transport into and out of dental enamel, which protects the enamel surface against caries and erosive destruction. The quality and quantity of this pellicle determine its protective potential [Hannig and Balz, 2001].

When the equilibrium of these salivary functions and characteristics is broken, one of the lesions that can affect teeth is erosion, which is defined as mineralized tissue dissolution of teeth exposed to a constant acid environment. These acids can originate from the organism itself, as in cases of bulimia or regurgitation, or from extrinsic sources, such as food and beverages. The process is cumulative and progressive and causes substantial loss of dental structure, and consequently, dental sensitivity [Imfeld, 1996].

According to Lussi et al. [2004], erosive lesions formation is influenced by chemical factors related to: food (acid type, pH and buffer capacity, chelant effect, concentration of calcium and phosphate), behavior (consumption mode and frequency of ingesting acid food and beverages) and individual characteristics (saliva composition and properties)

Considering that saliva represents dental health protection, studies that provide details about children's salivary characteristics are important, because the child population is exposed to the hazard of dental structure loss as a result of the increasing consumption of acid liquids.

The objective of this study was to determine reference values, in 6 to 8 year-old schoolchildren, for salivary constituents, such as calcium and phosphate, as well as pH and buffer capacity.

## MATERIALS AND METHODS

Thirty-four children (16 boys and 18 girls), between the ages of 6 and 8 years, were selected by one examiner after dental prophylaxis and relative isolation. The participants presented the following characteristics: mixed dentition,

free of dental or soft tissue lesions, residents in a region with fluoridated water and not taking daily medicines.

The selected children were treated at the Dentistry Faculty of the University of Passo Fundo (FOUPF), Rio Grande do Sul, Brazil. They had been discharged from dental treatment in the period of 2004 to 2006 and were maintained under control with preventive measures. Participation in the research was subject to a signed term of Informed Consent being obtained from each child's legal guardian, which was approved together with the research project by the Ethics Committee of the University of Passo Fundo (Register Number CEP 217/2006).

The participants were given a kit with a toothbrush and a fluoride dentifrice (Colgate Maximum Anticaries Protection – 90g) 15 days before the beginning of saliva collections. All children were given oral hygiene instructions and were told to use only the toothbrush and the toothpaste they had received, to maintain their dietary habits, but they could not eat or drink 2 hours before the procedures. The saliva collections always occurred at the same time of the day, between 10:00 and 10:30.

As the children arrived at the clinic, they received plastic pots previously disinfected with 1% sodium hypochlorite and distilled water. The participants were instructed to spit into their pots at 2-minute interval [Azrak et al, 2003; Wiegand et al, 2006]. Four salivary collections were made from each child, with one week interval between them, always at the same time and with equal previous care.

The saliva samples were numbered and recorded in an electronic panel with the participant's name and date of collection. Sequentially, the saliva samples were stored in the refrigerator and afterwards they were frozen at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  for the biochemical analyses (pH, buffer capacity and amount of calcium and phosphate).

#### a) Salivary pH

To determine the salivary pH, 200  $\mu\text{L}$  of saliva were deposited in a 50ml receptacle and was diluted in ultra pure water 1:1 (Milli-Q – Millipore<sup>®</sup>). The pH meter used (DM-20 – Digimed<sup>®</sup>) was calibrated for 2 pattern solutions (pH 4.0 and 7.0) and identified pH variation with a precision of  $\pm 0.04$  [Wiegand et al, 2006].

#### b) Buffer Capacity (BC)

The salivary buffer capacity was determined by adding 25  $\mu\text{L}$  of 2% citric acid (pH 2.1) to the saliva samples in order to verify the reduction in pH [Bashir and Lagerlöf, 1996]. Three scores were adopted [Arzak et al, 2003; Sánchez and Preliasco, 2003]:

- High BC – 25% reduction of the initial pH
- Medium BC – 26 to 50% reduction of the initial pH
- Low BC – 51% reduction of the initial pH

#### c) Calcium amount

The calcium was determined through a colorimetric reaction using the reagent Arsenazo III Calcium (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda). The saliva samples were prepared by mixing 10 $\mu\text{L}$  of diluted saliva (1:1) with 100  $\mu\text{L}$  of color reagent. The salivary calcium reacted with the Arsenazo III, forming a complex of blue/violet color, whose intensity is proportional to the concentration in the sample. This complex was homogenized and submitted to a 37°C water bath for 2 minutes. After that, it was analyzed in a spectrophotometer with wave length of 650nm. All the saliva samples were made in duplicate and the quantity of calcium was determined by the arithmetic mean [Attin et al, 2005b; Wiegand et al, 2006].

#### d) Phosphate amount

The phosphate amount was also determined by the colorimetric method using a color reagent obtained by the mixture of Malaquita Green (2 parts) + ultra pure water (2 parts) + Polyvinyl alcohol (1 part) + Ammonium molybdate (1 part). In a receptacle, 100  $\mu\text{L}$  of diluted saliva (1:1), 100  $\mu\text{L}$  of ultra pure water and 1 mL of color reagent were mixed. The mixture was homogenized for 20 minutes and read in a spectrophotometer with wave length of 630nm [Chan et al., 1986].

#### e) Statistical analyzes

The saliva samples were analyzed by mixed model statistics (type of ANOVA) with the software SAS 8.02 (SAS System Inc.; Cary, NC, USA).

The individuals' mean values and among the group were considered at a confidence interval of 95% ( $p \leq 0.05$ ). The dependent variables were pH, buffer capacity and amount of calcium and phosphate. The fixed events (explicative

variables) were salivary collection data for each individual and for the entire group. The covariance structure used was the variance components and the estimation method for the groups' differences was the Tukey-Kramer Test.

## RESULTS

Considering the salivary parameters analyzed, no statistically significant difference was observed either between boys and girls or among the four initial analyses made for each child. The pH, buffer capacity, amount of calcium and phosphate values were described by the means of the samples (Table 1).

With regard to the variables pH, calcium and phosphate, no statistical difference was observed among the 34 participants (Figures 1, 2 and 3)). Nevertheless, salivary buffer capacity presented significantly different values ( $p=0.038$ ). Taking into consideration categorical distribution, 67.6% of the participants presented high buffer capacity and 32.4% of them had moderate buffer capacity. None of the individuals presented low buffer capacity (Figure 4).

Table 1. Mean values (n=34), maximum and minimum values, Standard deviation, Standard error and confidence interval ( $p$ ) of the salivary variables

	Mean	Max	Min	Standard Deviation	Standard Error	$p$
pH	7.257	7.86	6.82	0.273	0.047	0.435
Buffer capacity*	23.933	33.5	16.25	5.02	0.861	0.038
Calcium (mmol/L)	1.120	1.59	0.72	0.205	0.035	0.678
Phosphate (mmol/L)	4.297	6.10	2.70	0.815	0.139	0.737

\* Percentage reduction of the initial pH after the addition of 2% citric acid 2% (pH 2.1).

Considering the interdependence among the variables (Pearson's correlation), there was a strong correlation between calcium and phosphate and a positive interaction of these variables with the buffer capacity values. As regards pH, there was no significant correlation with other variables (Figures 5, 6 and 7)).

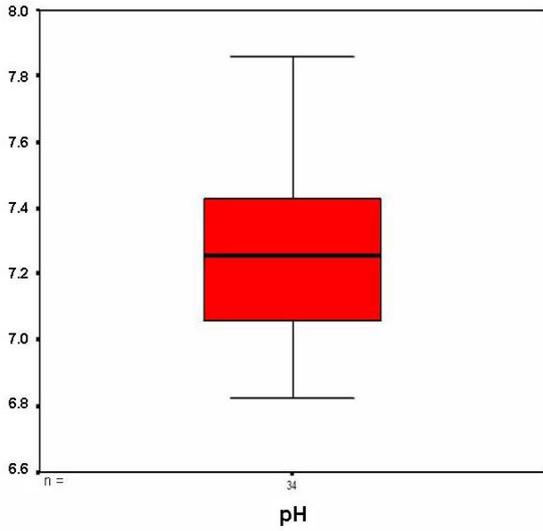


Figure 1. Bloxplot graph of pH.

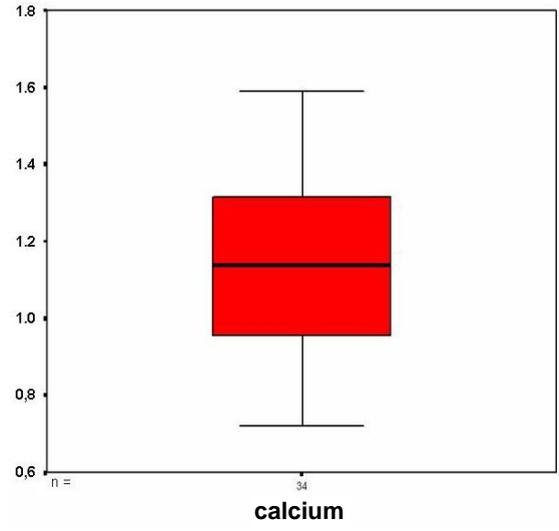


Figure 2. Bloxplot graph of calcium.

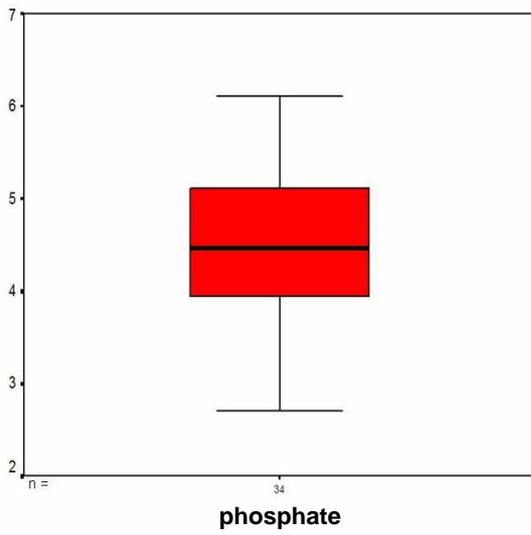


Figure 3. Bloxplot graph of phosphate

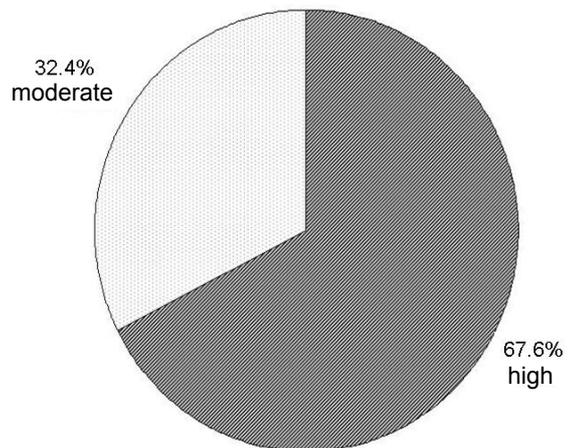
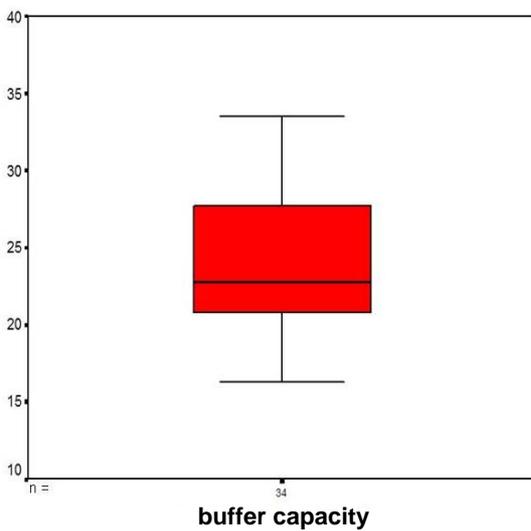


Figure 4. Bloxplot graph and categorical distribution of buffer capacity

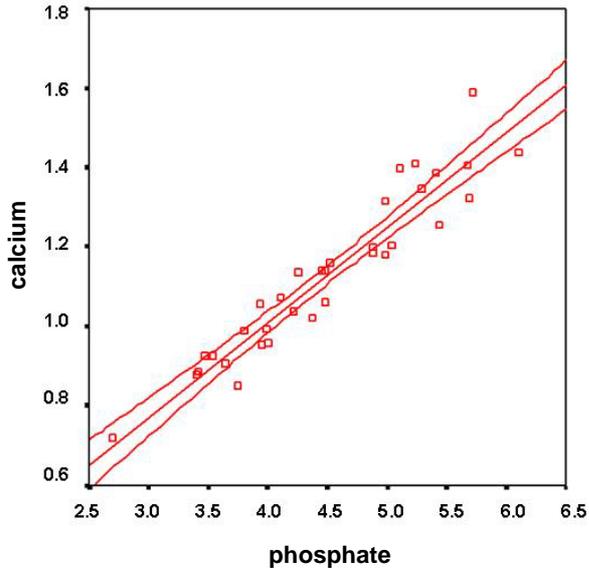


Figure 5. Positive correlation between calcium and phosphate

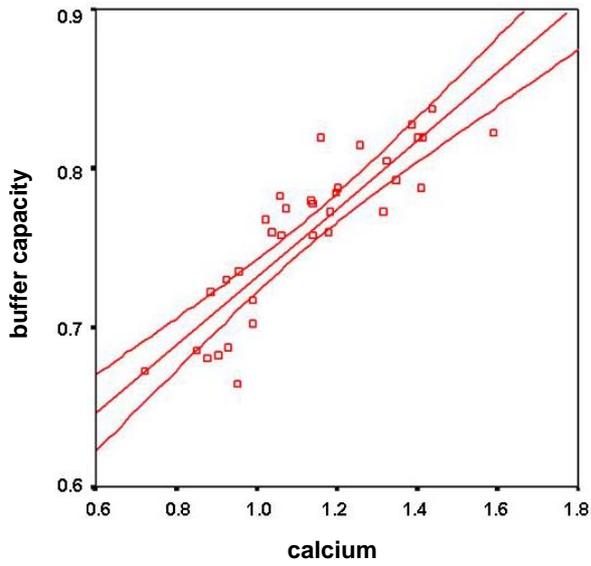


Figure 6. Positive correlation between calcium and buffer capacity

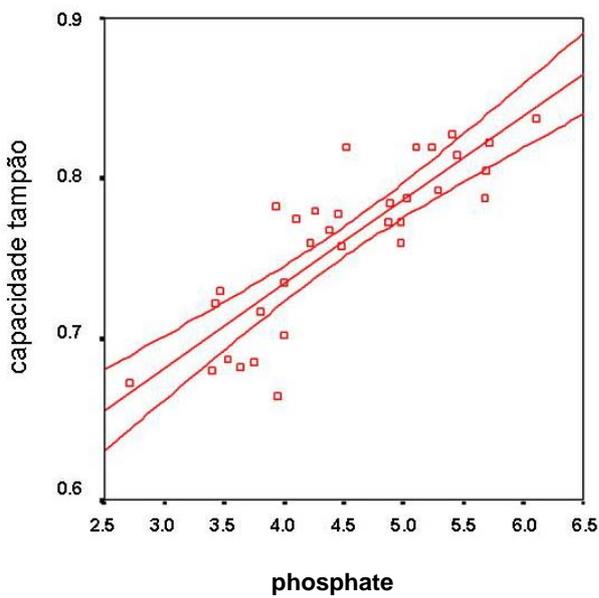


Figure 7. Positive correlation between buffer capacity and phosphate

## DISCUSSION

Saliva varies in quantity and quality; it differs in its structure, composition and thickness depending on which gland produces it. Due to its constituents and characteristics, saliva is important for the protection of teeth and oral mucosa [Carey and Vogel, 2000; Hannig and Balz, 2001].

Salivary flow and buffer capacity are among the most important characteristics, because they neutralize and eliminate acids of bacterial or food metabolism from the oral cavity. These two characteristics, combined with pH and calcium and phosphate concentrations, are subject to strong individual fluctuations, varying according to the moment and day of the exam [Larsen and Nyvad, 1999, Zero and Lussi, 2005].

In this research, the 34 participants did not present statistically significant difference ( $p>0.05$ ) among the four saliva samples collected with an interval of one week. No difference was observed among the participants, considering mean pH, calcium and phosphate values. The buffer capacity values showed a small variation ( $p=0.038$ ). This possibly occurred due to the inclusion criteria of the children in the sample group, the similarity among participants, and the previously established routine performed at all stages of the salivary exams.

The physiological variation of the nonstimulated saliva pH is between 6.5 and 7.5. Nevertheless, this value represents a momentary state of the oral cavity during collection. The most important factor is to maintain it near neutrality and this function is exerted by salivary buffers [Bashir and Lagerlöf, 1996; Jensdottir et al., 2005].

Individuals with rest pH around 7.0 normally present no or little caries or erosion activity [Hicks, Garcia-Godoy and Flaitz, 2003]. In this study a mean pH of 7.25 was observed, ranging from 6.8 to 7.8, which is similar to the studies involving children of the same age [O'Sullivan and Curzon, 2000a; Anderson et al., 2001; Azrak et al., 2003; Sánchez and Preliasco, 2003].

Considering buffer capacity, all the evaluated children presented moderate to high values; these results were similar to those of Sánchez and Preliasco [2003]. According to O'Sullivan and Curzon [2000a], buffer capacity is directly influenced by the amount of calcium and phosphate present in oral fluids. This was also observed in the present research, due to the positive correlation

between buffer capacity and amount of calcium and phosphate in the analyzed samples.

The amount of calcium ranged from 0.72 to 1.59 with a mean value of 1.12 mmol/L. Considering phosphate, the variation was even worse, from 2.70 to 6.10 with a mean value of 4.29 mmol/L. Despite the variations among the collected samples, the participants presented no significant differences among them ( $p=0.678$  and  $0.737$  for calcium and phosphate respectively). These values were similar to those found by Anderson et al. [2001] and Wiegand et al. [2006] who also evaluated children's saliva. Anderson et al. [2001] found a difference between the amount of salivary calcium in children and adults, who presented significantly higher values. Thus, they justified that the critical pH for dental demineralization in children is higher, and consequently, a small variation in oral pH is enough to dissolve hydroxyapatite crystals. As reference values, children with salivary pH below 6.5, in addition to low buffer capacity presented a considerably higher dental erosion risk than adults, whose critical pH is around 5.5 [O'Sullivan and Curzon, 2000a, 2000b; Johansson et al., 2001].

After dental demineralization due to an erosive challenge, saliva presents a reparative value and buffer capacity is more important than salivary flow in this case. When acids are neutralized or eliminated from the dental surface, salivary deposition of calcium and phosphate result in remineralization of the demineralized tissues and fill the microscopic defects [Hannig and Balz, 2001]. Moreover, calcium present in saliva and acquired pellicle also has an important role in fluoride incorporation and retention [Eisenburger et al., 2001; Ganss et al., 2001; Whitford et al., 2002].

As primary teeth present thick enamel layers and ample pulpal chambers, the development of erosive lesions can rapidly cause dentinal sensitivity or endodontic involvement, which can result in dental destruction or even in early tooth loss (Shaw and O'Sullivan, 2000; Ganss, Klimed and Giese, 2001).

Ingestion of some foods can influenced salivary functions. For example, the citric acid in juices and soft drinks is a powerful gustatory stimulus that facilitates its elimination from dental surfaces. On the contrary, it has a chelant effect that attracts calcium and can reduce the buffer effect of saliva [Lussi and Schaffner, 2000; Eisenburger et al., 2001]. Conversely, food with calcium and phosphate help to protect teeth and minimize the formation of erosion lesions. This is the

case of yogurts which, in addition to their low pH ( $\pm 4.0$ ), have a minimal erosive effect due to their high calcium and phosphate contents [Attin et al., 2005].

Salivary exams are useful for predicting and diagnosing erosion and caries, mainly because they are not invasive and are able to identify changes in the normal patterns of salivary components. Chemical composition analysis can be influenced by physiological variations such as age, diet and circumstances under which saliva was collected. Thus, it is necessary to minimize external stimulus. Considering the studied parameters, the main saliva analyses to make are to determine its buffer capacity and quantity of calcium, which directly influence the development of erosive lesion.

## CONCLUSIONS

- The group of children studied presented neutral values for salivary pH
- Salivary buffer capacity was classified as high in 67.6% of the children and as moderate in 32.4% of them.
- There was a positive correlation between the amounts of calcium and phosphate and between these ions and their buffer capacities.
- The examined parameters suggested that the analyses of salivary factors are important for predicting higher individual susceptibility to developing erosion lesion when in the presence of risk factors.

## REFERENCES

Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paed Den* 2001; 11: 266-273.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Diseases*, 2005; 11:7-12.

Attin T, Becker K, Hannig C, et al. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005; 39: 432-436.

Azrak B, Callaway A, Knözinger S, et al. Reduction of the pH-values of whole saliva after the intake of apple juice containing beverages in children and adults. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1:229-236.

Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relations between medications intake, complaints of dry mouth, saliva flow rate, saliva composition and the rate of human tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* 2001; 46:413-423.

Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B et al. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. *Caries Res* 2003; 37: 232-236.

Bashir E, Lagerlöf F. Effect of citric acid clearance on the saturation with respect to hydroxyapatite in saliva. *Caries Res* 1996; 30: 213-217.

Carey CM, Vogel GL. Measurement of calcium activity in oral fluids by ion selective electrode: method evaluation and simplified calculation of ion activity products. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 2000; 105: 267-273.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-380.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA et al. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35: 211-215.

Ganss C, Klimed J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents – a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2001; 29: 264-271.

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures of erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001; 35:325-330.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001; 35: 142-148.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralisation (part 1). *J Clin Paed Dent* 2003; 28:47-52.

Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-155.

Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries Res* 2005; 39: 468-474.

Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth – an in vivo and in vitro study. *J Dent* 2001; 29: 333-340.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81-87.

Lussi A; Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000; 34: 182-187.

Lussi A; Jaeggi T; Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 34-44.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000a; 34: 82-87.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000b; 67: 186-192.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases* 2002; 8:117-129.

Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 251-257.

Shaw L, O'Sullivan E. Diagnosis and prevention of dental erosion in children. *Int J Paediatr Dent*, 2000; 10: 356-365.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000; 50:140-161.

Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 82-86.

Vogel A. *Análise Química Quantitativa*. 6ª Ed. LTC 2002; Cap.17: 351-385.

Wiegand A, Müller J, Werner C et al. Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German Kindergarten Children. *Oral Diseases* 2006; 12: 117-124.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent of plaque calcium concentrations. *Caries Res*, 2002; 36: 256-265.

Zero DT, Lussi A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.



---

## Avaliação do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e de fosfato salivar em crianças após a ingestão de sucos de laranja industrializados e refrigerante tipo cola: estudo *in vivo*

---

Patussi EG<sup>1</sup>, Almeida ICS<sup>2</sup>, Costa Filho LC<sup>3</sup>, Costa CC<sup>4</sup>

5. Mestre e aluno do Doutorado em Odontologia da UFSC, área de concentração Odontopediatria. Professor das disciplinas Odontopediatria I, II e III da FOUPF.
6. Doutora em Odontopediatria pela USP-Bauru. Professora das disciplinas Odontopediatria I e II da UFSC. Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC.
7. Doutor em Medicina pela UFRG. Professor da FOPUC-RS
8. Doutora em Odontologia pela UFSC, área de concentração Odontopediatria.

### RESUMO

**Objetivos:** avaliar as modificações que ocorreram na saliva de crianças, de seis a oito anos de idade, após a ingestão de diferentes bebidas: suco de laranja com baixa capacidade tampão (grupo 1), suco de laranja com alta capacidade tampão (grupo 2), refrigerante tipo cola (grupo 3) e água mineral (grupo 4).

**Métodos:** verificação do pH, da capacidade tampão e da quantidade de cálcio e de fosfato salivares – antes (controle) e decorridos 1, 5, 15 e 30 minutos da ingestão das bebidas.

**Resultados:** a água foi a única bebida que não provocou alterações nas características salivares. Nos outros grupos, o pH salivar, inicialmente neutro, caiu para baixo de 6,0, normalizando-se em 15 minutos nos grupos 1 e 3 e em 30 minutos no 2. Além disso, o retorno à concentração inicial de cálcio e de fosfato somente foi observada no grupo 1. No grupo 3, ao final dos 30 minutos, apenas a concentração de fosfato se mostrou igual aos níveis originais e, por fim, no grupo 2, não houve normalização.

*Conclusão:* as bebidas testadas, com exceção da água, são potencialmente erosivas, uma vez que interferiram no equilíbrio dos constituintes salivares, alterando níveis de pH, cálcio e fosfato, além de que suas propriedades influenciaram no tempo de recuperação dos padrões iniciais salivares.

Palavras-chave: Erosão dentária; Saliva; pH; Capacidade tampão; Cálcio; Fosfato.

## INTRODUÇÃO

A erosão dentária pode ser definida como a dissolução do tecido dentário em um meio constantemente ácido, sem o envolvimento bacteriano. Os ácidos podem advir do próprio organismo, nos casos de regurgitação, ou de fontes exógenas, como os alimentos e as bebidas. Esse processo é cumulativo e progressivo, podendo proporcionar perda substancial da estrutura dentária e, conseqüentemente, sensibilidade dolorosa [1].

Essa doença tem atingido a população infantil e adolescente de maneira expressiva. Jones e Nunn [2] apontaram uma prevalência de 30% em crianças inglesas, de três anos de idade; Al-Malik, Holt e Bedi [3] observaram, na Arábia Saudita, 31% em crianças de dois a cinco anos de idade; Harding et al. [4] constataram uma prevalência de 42% de crianças irlandesas, com cinco anos de idade; Wiegand et al. [5], verificaram que 32% de crianças alemãs, entre dois e sete anos de idade, apresentavam pelo menos uma lesão erosiva em seus dentes. No Brasil, Peres et al. [6] reportam uma prevalência de 13 a 21%, em adolescentes de doze anos de idade. Outros estudos sugerem uma prevalência mais alta, como o de Al-Majed, Maguire e Murray [7], que reportaram uma prevalência de até 80% em crianças sauditas, assim como o de Jaeggi e Lussi [8], que encontraram, pelo menos, uma lesão erosiva em todas as crianças suíças examinadas.

A formação das lesões erosivas é influenciada por fatores químicos relacionados aos alimentos (tipo do ácido, pH e capacidade tampão, efeito quelante, concentração de cálcio e de fosfato); por fatores comportamentais (frequência e modo de consumo dos alimentos e bebidas ácidas); e por fatores

relacionados ao próprio indivíduo (fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, bem como o grau de saturação de cálcio e de fosfato) [9].

Quando um alimento ácido é ingerido, provoca uma queda no pH salivar e, conseqüentemente, na saturação de cálcio e de fosfato. Uma vez que o meio salivar está subsaturado, o equilíbrio desses íons é restaurado pela reposição de minerais oriundos dos dentes [10]. De acordo com Anderson, Hector e Rampersad [11], indivíduos com baixa concentração de cálcio salivar apresentam o pH crítico para a desmineralização mais elevado. Assim, quando o pH salivar está abaixo de 4,5 em adultos, e 6,0 em crianças, os dentes perdem mineral para o meio bucal e, à medida que o pH se neutraliza, ocorre o processo inverso, e o esmalte volta a incorporar os íons perdidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análises bioquímicas da saliva (pH, capacidade tampão, quantidade de cálcio e fosfato), as modificações que ocorrem na cavidade bucal de crianças brasileiras, de seis a oito anos de idade, após a ingestão de diferentes bebidas – dois sucos de laranja industrializados, com diferentes capacidades tampão, um refrigerante tipo cola e uma água mineral, bem como o período de tempo que o organismo leva para retomar seus padrões de normalidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ▪ Participantes

Fizeram parte deste estudo 34 crianças (16 meninos e 18 meninas), com idade entre seis e oito anos, residentes em região com água de abastecimento fluoretada e que recebem atendimento odontológico permanente, na Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF), Rio Grande do Sul, Brasil. Todas elas estavam livres de lesões de cárie e erosão, verificadas após profilaxia, isolamento relativo e iluminação direta, por um único examinador, na clínica de Odontopediatria da FOUPF. A participação das crianças na pesquisa ficou condicionada à assinatura, por seu responsável legal, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado, juntamente com o projeto de

pesquisa, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (registro no CEP 217/2006).

▪ Seleção das bebidas utilizadas na pesquisa

Foram selecionadas duas marcas comerciais de suco de laranja industrializados (com valores de pH baixos e semelhantes entre si, e de capacidades tampão significativamente diferentes), um refrigerante tipo cola e uma água mineral. Realizou-se a análise bioquímica das bebidas, determinando-se o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato presentes na composição (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades bioquímicas das bebidas utilizadas no experimento.

Bebida	pH	CT *	Cálcio **	Fosfato **
Grupo 1 – Suco de laranja com Baixa CT (Ades <sup>®</sup> )	3,95	27,63	1,35	3,99
Grupo 2 – Suco de laranja com Alta CT (Suvalan sem açúcar <sup>®</sup> )	3,83	105,32	1,16	3,55
Grupo 3 – Refrigerante tipo cola (Coca-Cola <sup>®</sup> )	2,41	25,01	0,26	6,99
Grupo 4 – Água (Aquarel - Nestlé <sup>®</sup> )	6,99	0,2	0,33	0

\* CT: valor expresso em mL de solução de NaOH 0,1N para neutralizar 100ml da bebida.

\* Cálcio e Fosfato: valor expresso em mmol/L

▪ Ingestão das bebidas e coleta da saliva

Os participantes receberam um kit com uma escova dental e um dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries – 90g) 15 dias antes da ingestão das bebidas e, em seguida, foram orientados quanto à técnica de escovação e recomendados a utilizar somente a escova e o dentifrício fornecidos.

As 34 crianças fizeram parte dos quatro grupos experimentais, sendo que as bebidas foram oferecidas com um intervalo de uma semana entre cada uma delas e, como controle, foram utilizadas as amostras iniciais da saliva, antes da ingestão das bebidas. Todas foram instruídas a manter seus hábitos alimentares, porém não deveriam comer nem beber por 2 horas antes dos procedimentos, e

as coletas salivares ocorreram sempre no mesmo período do dia, entre 10h e 10h30min.

Ao chegarem à clínica, as crianças recebiam cinco potes de polietileno, previamente desinfetados (hipoclorito de sódio 1% e enxaguados com água destilada), com as marcações correspondentes ao período de tempo da coleta salivar, juntamente com instruções para cuspir dentro dos mesmos, sempre que fossem solicitados [5,12]. Após a coleta inicial da saliva, a bebida determinada para o dia era fornecida, em copos plásticos graduados com 250 mL. As bebidas estavam geladas, com temperatura em torno de 10°C, e as crianças foram orientadas a tomá-las em até 2 minutos. Finalizado o consumo, a saliva era novamente coletada – 1, 5, 15 e 30 minutos após a ingestão. Em seguida, as amostras salivares foram armazenadas em geladeira e, posteriormente, congeladas a uma temperatura de -20°C (freezer), para análise bioquímica.

As amostras salivares foram numeradas e registradas em planilha eletrônica, com o nome do participante, grupo e tempo da coleta. Em seguida, foram “cegadas” e aleatorizadas, exceto as amostras iniciais, que serviam para controle e verificação da capacidade tampão, de modo que o examinador não sabia qual amostra iria analisar.

#### ▪ Análise bioquímica da saliva

##### pH salivar

Para determinação do pH salivar, depositaram-se 200 µL da saliva em um béquer de 50 mL, diluindo-a 1:1 com água ultrapura (Milli-Q – Millipore®). O pHmetro utilizado (DM-20 – Digimed®) foi calibrado com duas soluções padrões (pH 4,0 e 7,0), identificando as variações do pH com uma precisão de  $\pm 0,04$  [5].

##### Capacidade Tampão (CT)

A capacidade tampão salivar foi determinada adicionando-se 25 µL de ácido cítrico 2% (pH 2,1) nas amostras iniciais da saliva, verificando-se a redução do pH [13]. Dessa maneira, três escores foram adotados [12,14]:

- Alta CT – redução de até 25% do pH inicial
- Média CT – redução de 26 a 50% do pH inicial
- Baixa CT – redução de mais de 51% do pH inicial

### Quantidade de cálcio

O cálcio foi determinado através de uma reação colorimétrica, a partir da utilização do reagente Cálcio Arsenazo III (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda). As amostras salivares foram preparadas misturando-se 10 µL da saliva diluída (1:1) com 100 µL do reagente de cor. O cálcio salivar reage com o Arsenazo III, formando um complexo de coloração azul / violeta, cuja intensidade é proporcional à concentração presente na amostra. Esse complexo foi homogeneizado e submetido a um banho em água a 37°C por 2 minutos e, em seguida, levado ao espectrofotômetro, onde foi analisado com um comprimento de onda de 650nm. Todas as análises salivares foram feitas em duplicata, de modo que a quantidade de cálcio era determinada pela média aritmética [5, 15].

### Quantidade de fosfato

A determinação da quantidade de fosfato também foi feita pelo método colorimétrico, utilizando-se o reagente de cor obtido através da mistura de Verde Malaquita (2 partes) + Água ultrapura (2 partes) + Álcool Polivinílico (1 parte) + Molibdato de Amônio (1 parte). Foram pipetados em um béquer 100 µL da saliva diluída (1:1), na qual foram adicionados 100 µL de água ultrapura e 1 mL do reagente de cor. Essa mistura foi homogeneizada por 20 minutos e, posteriormente, lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 630nm [16].

### ▪ Análise estatística

Para a análise das amostras salivares, tanto antes quanto após as exposições às bebidas, foram utilizados modelos mistos (tipo de ANOVA) com o software SAS 8.02 (SAS System Inc.; Cary, NC, USA). Levou-se em consideração a interdependência entre as observações, ou seja, os valores individuais conforme a bebida ingerida, bem como as variações médias do grupo, aleatorizando os indivíduos e utilizando um intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). A estrutura de covariância utilizada foi a Componentes de Variância e o método de estimação de diferenças entre os grupos foi o Tukey-Kramer.

As variáveis dependentes foram o pH, a Capacidade Tampão (CT), a quantidade de Cálcio e de Fosfato, e os efeitos fixos (variáveis explicativas) foram o tempo da coleta da saliva e a bebida ingerida, para cada indivíduo e para o grupo todo.

## RESULTADOS

A descrição dos valores na linha de base foi feita pela média do grupo amostral, uma vez que não se observou diferença significativa entre as quatro análises salivares iniciais de cada criança (tempo zero), nem entre os gêneros (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios, desvio padrão, erro padrão e intervalo de confiança ( $p$ ) das variáveis analisadas na saliva inicial (tempo zero).

n = 34	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	$p$
pH	7,257	0,273	0,047	0,435
Capacidade Tampão*	23,933	5,02	0,861	0,038
Cálcio (mmol/L)	1,120	0,205	0,035	0,678
Fosfato (mmol/L)	4,297	0,815	0,139	0,737

\* Porcentagem de redução do pH inicial após adição de ácido cítrico a 2% (pH 2,1).

Os resultados mostram que, dentre as variáveis analisadas, houve diferença estatisticamente significativa somente para a capacidade tampão ( $p=0,038$ ). Quanto à distribuição categórica, 67,6% dos participantes apresentaram uma alta capacidade tampão (redução de até 25%), seguidos de 32,4% com moderada (redução de 26 a 50%). Nenhuma criança apresentou capacidade tampão baixa. Em relação ao pH e à quantidade de cálcio e de fosfato, não houve diferença significativa entre os participantes.

Analisando-se as variáveis, observaram-se uma forte correlação entre cálcio e fosfato, bem como uma interação positiva dessas variáveis com os valores de capacidade tampão (correlação de Pearson). Em relação ao pH, não houve correlação significativa com as outras variáveis no tempo zero.

Imediatamente após a ingestão das bebidas com pH ácido (grupos 1, 2 e 3), verificou-se uma queda significativa no pH salivar das crianças, fato que não ocorreu no grupo 4, no qual a bebida era a água, com pH neutro. Em seguida, após 5 minutos, observou-se um aumento do pH salivar nos três primeiros grupos, entretanto, permanecendo ainda abaixo da neutralidade observada nas amostras-controle. Decorridos 15 minutos, o pH salivar se mostrou sem diferença significativa do valor inicial nos grupos 1 ( $p=0,123$ ) e 3 ( $p=0,439$ ), respectivamente suco com baixa capacidade tampão e refrigerante. Somente aos 30 minutos é que se observou um pH neutro no grupo 2 ( $p=0,255$ ) – no qual as crianças ingeriram o suco com alta capacidade tampão (Figura 1).

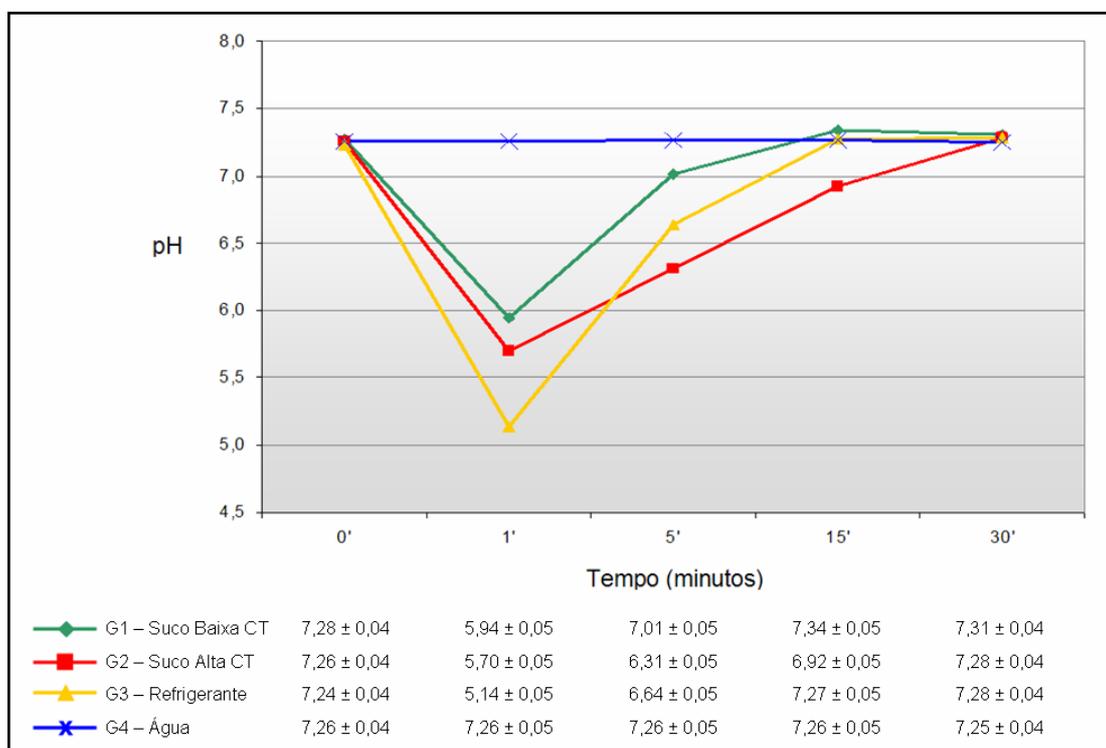


Figura 1. Variação média do pH salivar ( $\pm$  erro padrão) após a ingestão das bebidas experimentais, de acordo com o intervalo de tempo.

A saliva das crianças apresentou, no tempo zero, uma média de 1,12 mmol/L de cálcio e 4,30 mmol/L de fosfato, correspondente à saturação normal. Imediatamente após a ingestão das bebidas ácidas, constatou-se uma queda significativa dos valores desses íons ( $p \leq 0,05$ ), ao passo que, decorridos 5

minutos, verificou-se o aumento na quantidade dos mesmos na saliva, acima dos valores iniciais.

Analisando-se o tempo que a saliva levou para retornar à concentração normal de cálcio e de fosfato, somente nas amostras expostas ao suco com baixa CT (grupo 1), verificou-se o retorno ao equilíbrio original – após 15 minutos observou-se uma concentração de cálcio sem diferença estatisticamente significativa em relação ao valor inicial ( $p=1$ ), além de forte tendência ( $p=0,046$ ) de normalização da quantidade de fosfato que, na última coleta, se mostrava equilibrado. Já em relação ao refrigerante (grupo 3), 30 minutos não foram suficientes para a concentração de cálcio salivar se normalizar ( $p=0,029$ ), apenas a quantidade de fosfato se mostrou sem diferença significativa dos níveis originais ( $p=1$ ). Por fim, as amostras salivares expostas ao suco de laranja com alta CT (grupo 2), mesmo depois de 30 minutos, não voltaram à normalidade inicial (Figuras 2 e 3).

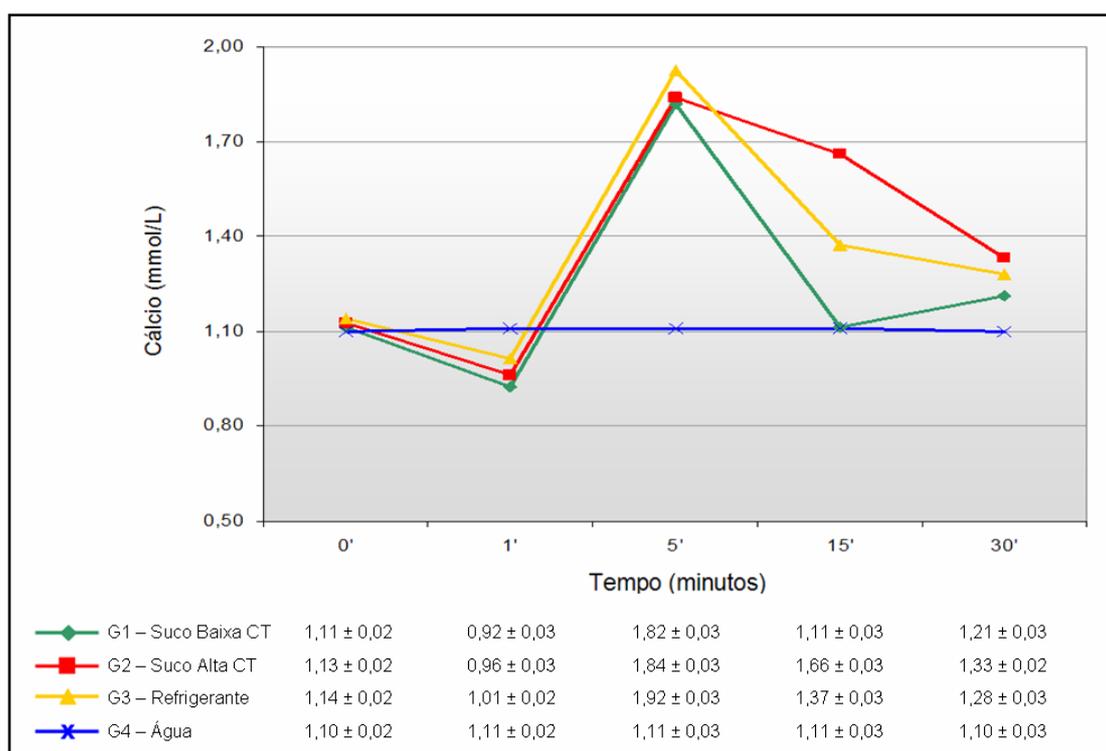


Figura 2. Variação média da quantidade de cálcio salivar ( $\pm$  erro padrão) após a ingestão das bebidas experimentais, de acordo com o intervalo de tempo.

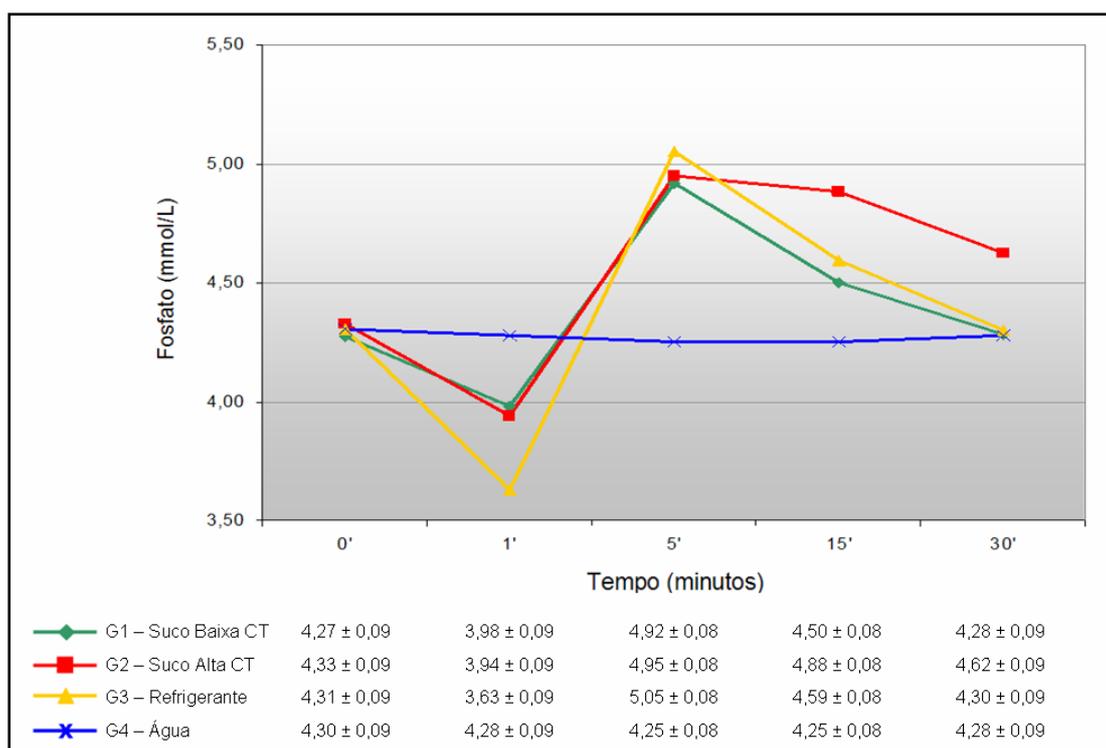


Figura 3. Variação média da quantidade de fosfato salivar ( $\pm$  erro padrão) após a ingestão das bebidas experimentais, de acordo com o intervalo de tempo.

## DISCUSSÃO

Alguns fatores influenciam o pH salivar quando ocorre a ingestão de alimentos ácidos. No estudo da erosão dentária, é importante verificar as características da bebida, o método de ingestão e os fatores individuais, principalmente os relacionados às propriedades salivares [17,18].

O fluxo e a capacidade tampão da saliva são fatores que influenciam o desenvolvimento de lesões erosivas devido à eliminação e à neutralização dos ácidos da cavidade bucal. Essas duas características, bem como o pH e a concentração de cálcio e de fosfato, variam conforme o indivíduo, o horário e o dia em que a saliva é coletada [9].

Em relação à capacidade tampão, encontraram-se diferenças significativas entre os 34 participantes, contudo valores médios semelhantes aos apontados por Sánchez e Preliasco [14], constatando-se que a maioria das crianças saudáveis apresentou de moderada a alta capacidade de manter o pH

salivar neutro. De acordo com O'Sullivan e Curzon [17], indivíduos livres de patologias bucais demonstraram uma capacidade tampão mais elevada, ao passo que aqueles com erosão dentária apresentaram capacidade tampão reduzida. Relataram também que a capacidade tampão é influenciada diretamente pela quantidade de cálcio e de fosfato presentes nos fluidos bucais, característica que tende a aumentar com a idade. Neste estudo, verificou-se uma forte correlação positiva entre a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato presentes nas amostras salivares avaliadas. Para Bardow et al. [19] e Jensdottir et al. [20], nas lesões erosivas, a capacidade tampão salivar exerce efeito protetor superior ao fluxo salivar, diferindo das lesões de cárie, nas quais o fluxo salivar é mais importante.

Quanto ao valor médio do pH salivar das crianças avaliadas, observou-se que está dentro da variação normal ao ser humano, de 6,5 a 7,5 [13,20], e semelhante ao encontrado em estudos envolvendo crianças na mesma faixa etária [11, 12, 14, 17]. O valor de pH no qual os cristais de hidroxiapatita começam a se dissolver é conceituado como pH crítico para a desmineralização dentária. Nas crianças, em virtude da menor concentração de cálcio do que em adultos, o pH crítico concentra-se na faixa de 6,0 [11].

As bebidas experimentais utilizadas no presente estudo, com exceção da água, foram capazes de reduzir significativamente o pH salivar, inicialmente neutro, para valores abaixo do crítico. A queda mais expressiva foi ocasionada pelo refrigerante tipo cola, cujo pH endógeno é mais baixo do que dos sucos, reduzindo o pH salivar de 7,24 para 5,41. Após 5 minutos, todos os grupos já apresentavam um valor acima de 6,0, porém ainda diferentes do pH inicial. Aos 15 minutos, apenas o suco com a alta capacidade tampão ainda não havia sido neutralizado, o que ocorreu no tempo 30 minutos. Esse período de recuperação do pH transcorreu de maneira similar aos estudos de Meurman et al. [21]; Bashir e Lagerlöf [13]; Millward et al. [22]; Azrak et al, 2003 [12]; Sánchez e Preliasco [14] 2003; Bainghton et al. [23]; Jensdottir et al. [20]. Os dados da maioria são provenientes de adultos e, segundo Anderson, Hector e Rampersad [11], em crianças, esses índices provavelmente levariam mais tempo para serem restaurados, sugerindo, de acordo com Hunter et al. [24,25], que o risco de erosão em crianças se torna maior que nos adultos.

Junto ao declínio do pH salivar, observou-se uma redução imediata da concentração de cálcio e de fosfato, deixando a saliva subsaturada em relação aos tecidos mineralizados dos dentes. Com o pH salivar abaixo do crítico para desmineralização, ocorre a dissolução de cristais de hidroxiapatita na tentativa de neutralizar sua acidez. Assim, decorridos 5 minutos da ingestão das bebidas ácidas, verificou-se um aumento na concentração salivar de cálcio e de fosfato, bem como o início do retorno do pH para neutralidade inicial. A saliva tornou-se então supersaturada, fazendo com que o cálcio e o fosfato gradativamente retornassem aos dentes, remineralizando-os. O tempo para essa recuperação, entretanto, variou significativamente entre os grupos experimentais, em função das características inerentes às bebidas, mais especificamente à sua capacidade tampão.

Da mesma maneira que os tampões salivares são responsáveis por manter o pH próximo da neutralidade, os tampões das bebidas tendem a conservar seu pH endógeno, no caso deste estudo, ácido. Assim, ocorre uma disputa entre esses tampões, o que desencadeia em diferentes tempos de neutralização do pH salivar, com repercussão direta na saturação de cálcio e de fosfato salivares. De acordo com Larsen e Nyvad [26], uma bebida com alta capacidade tampão é capaz de produzir lesões erosivas semelhantes a uma bebida com um ponto a menos no pH. Nesse sentido, verificou-se que o suco com a maior capacidade tampão foi a bebida que deixou a saliva ácida por mais tempo e que, mesmo decorridos 30 minutos após sua ingestão, os níveis de cálcio e de fosfato salivares ainda não estavam normalizados, representando um risco extra à erosão dentária.

Além disso, as características químicas do alimento ácido se misturam com as funções salivares, proporcionando estímulos salivares variados. O ácido cítrico que compõe os sucos de laranja, quando comparado com bebidas carbonatadas, exerce um estímulo gustatório mais intenso, bom para acelerar a auto-limpeza e a eliminação da cavidade bucal [27,28]. Contudo, esse ácido apresenta efeito quelante, que modifica o processo erosivo *in vivo* pela interação com a saliva ou dissolução direta dos minerais dentários [29].

Assim, tratamentos que atuem mais diretamente sobre essas características, estimulando o aumento de cálcio na saliva ou nas bebidas ácidas, reduzindo sua capacidade tampão, tendem a minimizar seu potencial erosivo,

como também fazer com que o pH não sofra tanta oscilação e que retorne mais rapidamente à neutralidade [30].

## CONCLUSÕES

- As três bebidas que apresentavam o pH ácido (sucos de laranja e refrigerante) foram capazes de alterar significativamente as propriedades salivares estudadas, reduzindo o pH e alterando a saturação de cálcio e de fosfato.
- O refrigerante foi a bebida que provocou a queda mais expressiva no pH salivar, entretanto, o suco de laranja com alta capacidade tampão foi a bebida que deixou a saliva ácida por mais tempo, bem como foi única bebida que fez com que a saturação de cálcio e de fosfato não retornasse à normalidade.
- Das bebidas ácidas avaliadas, o suco de laranja com a baixa capacidade tampão constitui-se com a bebida com o menor potencial erosivo, seguido pelo refrigerante e, por último, pelo suco de laranja com a alta capacidade tampão.

## REFERÊNCIAS

1. Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-155.
2. Jones SG, Nunn JH. The dental health of 3-year-old children in East Cumbria 1993. *Community Dent Health* 1995; 12: 161-166.
3. Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R. The relationship between erosion caries and rampant caries, and dietary habits in preschool children in Saudi Arabia. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 430-439.
4. Harding MA, Whelton H, O'Mullane DM et al. Dental erosion in 5-year-old Irish school children and associated factors: a pilot study. *Community Dent Health* 2003; 20: 165-170.
5. Wiegand A, Müller J, Werner C et al. Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German Kindergarten Children. *Oral Diseases* 2006; 12: 117-124.
6. Peres KG, Armênio MF, Peres MA et al. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. *Int J Paed Dent* 2005, v. 15, p. 249-255.
7. Al-Majed I, Maguire A, Murray JJ. Risk factors for dental erosion in 5-6 year old and 12-14 year old boys in Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 38-46.

8. Jaeggi T, Lussi A. Erosion in early school-age children. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2004; 114: 876-881.
9. Lussi A; Jaeggi T; Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 34-44.
10. West NX, Maxwell A, Hughes JA, et al. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998; 26: 329-335.
11. Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 266-273.
12. Azrak B, Callaway A, Knözinger S, et al. Reduction of the pH-values of whole saliva after the intake of apple juice containing beverages in children and adults. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1:229-236.
13. Bashir E, Lagerlöf F. Effect of citric acid clearance on the saturation with respect to hydroxiapatita in saliva. *Caries Res* 1996; 30: 213-217.
14. Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 251-257.
15. Attin T, Becker K, Hannig C et al. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005; 39: 432-436.
16. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-380.
17. O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000; 34: 82-87.
18. Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 484-489.
19. Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B et al. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. *Caries Res* 2003; 37: 232-236.
20. Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C et al. Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries Res* 2005; 39: 468-474.
21. Meurman JH, Rytömaa I, Kari K et al. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 1987; 21: 353-359.
22. Millward A et al. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res* 1997;31: 44-49.
23. Bainghton B, Brailsford SR, Gilbert SC, et al. Intra-oral acid production associated with eating whole or pulped raw fruits. *Caries Res* 2004; 38: 341-349.
24. Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent* 2000; 28: 257-263.
25. Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent* 2000; 28: 265-270.
26. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81-87.
27. Lussi A; Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000; 34: 182-187.

28. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA et al. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35: 211-215.
29. Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:199-206.
30. Zero DT, Lussi A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.



---

## Evaluation of pH, buffer capacity and amount of salivary calcium and phosphate in children after the ingestion of industrialized orange juices and cola soft drink: *in vivo* study

---

Patussi EG<sup>1</sup>, Almeida ICS<sup>2</sup>, Costa CC<sup>3</sup>, Costa Filho LC<sup>4</sup>

9. Dr Patussi is professor of the disciplines of Pediatric Dentistry I, II and III of the University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.
10. Dr Almeida is professor, Post Graduation Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.
11. Dr Costa is captain and general dentist in the Military Police Force of the state of Rio Grande do Sul (Brigada Militar), Santa Maria, RS, Brazil.
12. Dr Costa Filho is professor of the Clinical Department, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil.

### ABSTRACT

**Objectives:** to evaluate the salivary modifications in children, from 6 to 8 years old, after the ingestion of different beverages – orange juice with low buffer capacity (group 1), orange juice with high buffer capacity (group 2), cola soft drink (group 3) and mineral water (group 4).

**Method:** verification of pH, buffer capacity and amounts of salivary calcium and phosphate before (control) and after 1, 5, 15 and 30 minutes of ingesting the beverages.

**Results:** Mineral water was the only beverage that did not modify salivary characteristics. In the other groups, the salivary pH, that was initially neutral, fell to below 6.0, and normalized after 15 minutes in groups 1 and 3, and after 30 minutes in group 2. Furthermore, a return to the initial concentration of calcium and phosphate was verified exclusively in group 1. In group 3, after 30 minutes, the phosphate concentration alone showed the original levels, and in group 2, there was no normalization.

**Conclusion:** The test beverages, excluding mineral water, interfere in the equilibrium of salivary constituents and altered the levels of pH, calcium and

phosphate. Moreover, the properties of the beverages influenced the recovery time of the initial salivary patterns.

Key words: dental erosion; saliva; pH; buffer capacity; calcium; phosphate.

## INTRODUCTION

Dental erosion can be defined as the dissolution of the dental tissue in a constant acid environment, without bacterial involvement. The acids can originate from the organism itself, as in the cases of regurgitation, or from extrinsic sources, such as foods and beverages. The process is cumulative and progressive. It can result in substantial loss of dental tissue and consequently, painful sensitivity [1].

This disease has afflicted children and adolescents in a significant manner. Jones and Nunn [2] related a prevalence of 30% in 3-year-old English children. Al-Malik, Holt and Bedi [3] observed a prevalence of 31% in children of 2.5 years old in Saudi Arabia. Harding et al. [4] alleged a prevalence of 42% in 5-year-old Irish children. Wiegand et al. [5] said that 32% of German children, between 2 and 7 years of age, presented at least one erosive lesion in their teeth. In Brazil, Peres et al. [6] reported a prevalence of 13 to 21% in 12-year-old teenagers. Other researches suggested a higher prevalence, such as the study of Al-Majed, Maguire and Murray [7], which related a prevalence of 80% in Saudi children. Furthermore, the study of Jaeggi and Lussi [8] found at least one erosive lesion in all Swiss children examined.

The formation of erosive lesions is influenced by diet-related chemical factors (type of acid, pH and buffer capacity, chelant effect, calcium and phosphate concentrations), by behavioral factors (frequency and mode of acid food and beverage consumption) and by factors related to the person itself (salivary flow, buffer capacity of the saliva, salivary saturation level of calcium and phosphate) [9].

When the acid substance is ingested, it causes a fall in the salivary pH and, consequently, in the calcium and phosphate saturation. When the salivary environment is sub-saturated, the equilibrium of these ions is restored by

replacement with minerals from the teeth [10]. According to Hector and Rampersad [11], individuals with low salivary calcium concentration presented a higher critical pH for demineralization. Thus, when the salivary pH is below 4.5 in adults and 6.0 in children, the teeth lose mineral to the oral environment and as the pH neutralizes, the inverse process occurs and the enamel incorporates the lost ions again.

The objective of this study was to evaluate, through biochemical analyses of the saliva (pH, buffer capacity and quantity of calcium and phosphate), the changes that occurred in the oral cavity of 6 to 8-year-old Brazilian children after ingesting different beverages – 2 industrialized orange juices with different buffer capacities, 1 cola soft drink and 1 mineral water. The period of time it took for the organism to return to its normality patterns was also evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### ▪ Participants

Thirty-four children (16 boys and 18 girls) participated in the study. The participants were between 6 and 8 years old, residents in a region with fluoridated water, and received permanent dental treatment at the Dentistry Faculty of the University of Passo Fundo (FOUPF), Rio Grande do Sul, Brazil. All the children were free from dental caries and erosion, verified after prophylaxis, relative isolation and direct illumination by one examiner at the Pediatric Dentistry Clinic of FOUPF. The research project was approved by the Ethics Committee of the University of Passo Fundo (registration number CEP 217/2006), which also approved the children's participation, after Informed Consent had been signed by their parents or legal guardians.

### ▪ Selection of the beverages used in the research

Two commercial brands of industrialized orange juice, with similar low pH values and significantly different buffer capacities, one cola soft drink and one

mineral water were selected. The chemical analyses of the beverages were made and the pH, buffer capacity and quantity calcium and phosphate were determined (Table 1).

Table 1: Chemical properties of the beverages

Beverage	pH	BC *	Calcium **	Phosphate **
Group 1 – Orange juice with low BC (Ades®)	3.95	27.63	1.35	3.99
Group 2 – Orange juice with high BC (Suvalan without sugar®)	3.83	105.32	1.16	3.55
Group 3 – Cola soft drink (Coca-Cola®)	2.41	25.01	0.26	6.99
Group 4 – Mineral water (Aquarel - Nestlé®)	6.99	0.2	0.33	0

\* BC (Buffer Capacity): value expressed in mL of NaOH 0,1N solution to neutralized 100ml of the beverage.

\* Calcium and phosphate: value express in mmol/L

#### ▪ Ingestion of beverages and saliva collection

Fifteen days before the beverages were ingested, the participants received toothbrushes, fluoride toothpaste and oral hygiene instructions and were told to use only the toothbrushes and toothpastes provided.

The 34 children were divided in 4 experimental groups and the beverages were offered with an interval of one week between them. The control groups were the initial saliva samples that were collected before the beverages were ingested. The participants were instructed to maintain their dietary habits, but they could not eat or drink 2 hours before the procedures. The saliva collections always occurred at the same time of the day, between 10:00 and 10:30 a.m.

When the children arrived at the clinic, they received 5 plastic pots, previously disinfected with sodium hypochlorite 1% and distilled water. The pots were marked with the time period of the salivary collection. The participants were instructed to spit into the pots every time they were asked to [5,12].

After the initial saliva collection, the beverage determined for the day was offered in 250 ml graduated plastic cups. The beverages were cold, at a temperature of 10°C, and the children were instructed to drink them in a maximum time of 2 minutes. When consumption ended, saliva was collected 1, 5, 15 and 30 minutes after the beverage ingestion. Sequentially, the salivary samples were

stored in the refrigerator and then they were frozen at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  for the biochemical analyses.

The salivary samples were numbered and recorded on an electronic panel with the participant's name, group and time of collection. The specimens were blinded and randomized, excluding the initial samples that were used for control and buffer capacity verification.

#### ▪ Saliva biochemical analyzes

##### Salivary pH

To determine the salivary pH, 200  $\mu\text{L}$  of saliva were deposited in a 50ml receptacle and was diluted in ultra pure water 1:1 (Milli-Q – Millipore®). The pH meter utilized (DM-20 – Digimed®) were calibrated for 2 pattern solutions (pH 4.0 and 7.0) and identified pH variation with a precision of  $\pm 0.04$  [5].

##### Buffer Capacity (BC)

The salivary buffer capacity was determined by adding 25  $\mu\text{L}$  of 2% citric acid (pH 2.1) to the initial saliva samples in order to verify the pH reduction [13]. Thus, three scores were adopted [12,14]:

- High BC – 25% reduction of the initial pH
- Medium BC – 26 to 50% reduction of the initial pH
- Low BC – 51% reduction of the initial pH

##### Calcium amount

The calcium was determined through a colorimetric reaction using the reagent Arsenazo III Calcium (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda). The saliva samples were prepared by mixing 10 $\mu\text{L}$  of diluted saliva (1:1) with 100  $\mu\text{L}$  of color reagent. The salivary calcium reacted with the Arsenazo III, forming a complex of blue/violet color, whose intensity is proportional to the concentration in the sample. This complex was homogenized and submitted to a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath for 2 minutes. After that, it was analyzed in a spectrophotometer with wave length of 650nm. All the salivary samples were made in duplicate and the quantity of calcium was determined by the arithmetic mean [5, 15].

### Phosphate amount

The phosphate amount was also determined by the colorimetric method using a color reagent obtained by the mixture of Malaquita Green (2 parts) + ultra pure water (2 parts) + Polyvinyl alcohol (1 part) + Ammonium molybdate (1 part). In a receptacle, 100  $\mu$ L of diluted saliva (1:1), 100  $\mu$ L of ultra pure water and 1 mL of color reagent were mixed. The mixture was homogenized for 20 minutes and read in a spectrophotometer with wave length of 630nm [16].

### ▪ Statistical analyses

To analyze the salivary samples before and after exposure to the beverages, a mixed model statistical analysis (type of ANOVA) was used with the software SAS 8.02 (SAS System Inc.; Cary, NC, USA). Interdependence among the observations was considered as the single values considering the beverage ingested and the mean variations of the groups. The individuals were randomized and a confidence interval of 95% ( $p \leq 0.05$ ) was used. The covariance structure used was the variance components; and the estimation method for the differences among the groups was the Tukey-Kramer Test.

The dependent variables were pH, buffer capacity and amounts of calcium and phosphate. The fixed effects (explicative variables) were time of salivary collection and type of beverage ingested for each participant and for the entire group.

## RESULTS

The description of the baseline values was made by the mean of the sample group, as there was no significant difference among the 4 initial salivary analyses in each of the children (time 0) or between the genders (Table 2).

Table 2. Mean values, standard deviation, error and confidence interval ( $p$ ) of the variables analyzed in the initial saliva (time 0).

n = 34	Mean	Standard Deviation	Error	$p$
pH	7.257	0.273	0.047	0.435
Buffer capacity*	23.933	5.02	0.861	0.038
Calcium (mmol/L)	1.120	0.205	0.035	0.678
Phosphate (mmol/L)	4.297	0.815	0.139	0.737

\* Percentage reduction of the initial pH after the addition of 2% citric acid 2% (pH 2.1).

The results indicated that among the analyzed variables, there was statistically significant difference only in the buffer capacity ( $p=0.038$ ). Considering the categorical distribution, 67.6% of the participants presented a high buffer capacity (reduction of 25% or less) and 32.4% had a moderate buffer capacity (reduction of 26% to 50%). No children presented low buffer capacity. In relation to the pH and the amount of calcium and phosphate, there was no significant difference among the participants.

When analyzing the variables, a strong correlation was observed between calcium and phosphate and a positive interaction of these variables with the buffer capacity values (Pearson correlation). Considering the pH, there was no significant correlation with the other variables at time zero.

Immediately after ingestion of the beverages with acid pH (groups 1, 2 and 3), a significant reduction in the children's salivary pH was observed. This did not occur in group 4, in which the beverage was water with neutral pH. After 5 minutes, an increase in salivary pH was observed in the first three groups; nevertheless, it remained below the neutrality observed in the control samples. After 15 minutes, the salivary pH was not significantly different from the initial value in groups 1 ( $p=0.123$ ), with low buffer capacity juice, and 3 ( $p=0.439$ ), with soft drink. A neutral pH was observed only after 30 minutes for group 2 ( $p=0.255$ ), in which the children ingested juice with high buffer capacity (Figure 1).

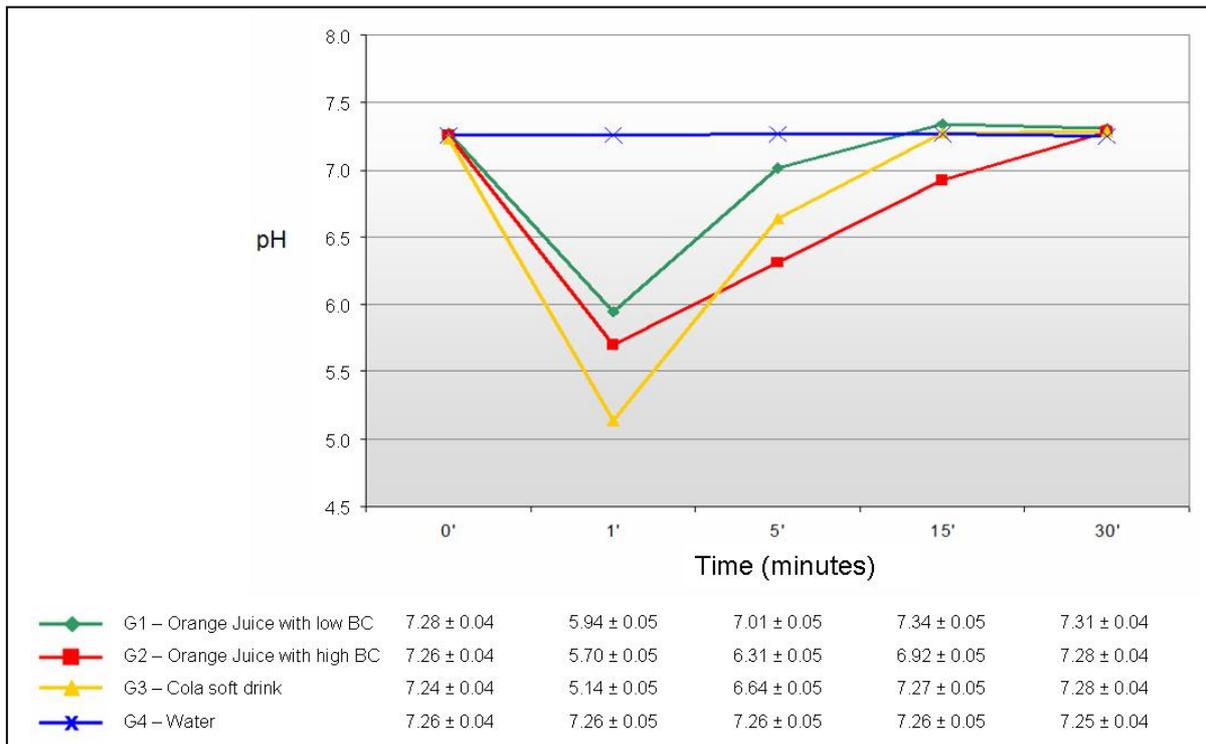


Figure 1. Mean variation of salivary pH ( $\pm$  error) after the ingestion of the experimental beverages according to the time intervals.

At time zero, the children's saliva presented a mean of 1.12 mmol/L of calcium and 4.30 mmol/L of phosphate, corresponding to normal saturation. Immediately after the ingestion of acid beverages, there was a significant drop in the values of these ions ( $p \leq 0.05$ ). After 5 minutes, an increase was verified in the quantity of these ions in the saliva, above the initial values.

When analyzing the amount of time the saliva took to return to normal concentration of calcium and phosphate, return to the original equilibrium was verified only the samples exposed to the low buffer capacity juice (group 1). After 15 minutes, a calcium concentration with no statistically significant difference in relation to the initial value ( $p=1$ ) was observed. A strong tendency ( $p=0.046$ ) towards phosphate quantity normalization also occurred, and it was equilibrated in the last collection. As regards the soft drink (group 3), the time of 30 minutes was not sufficient to normalize the salivary calcium concentration ( $p=0.029$ ). Only the amount of phosphate showed no significant difference from the original levels ( $p=1$ ). The salivary samples exposed to the orange juice with high buffer capacity (group 2), did not return to the initial normality after 30 minutes (Figures 2 and 3).

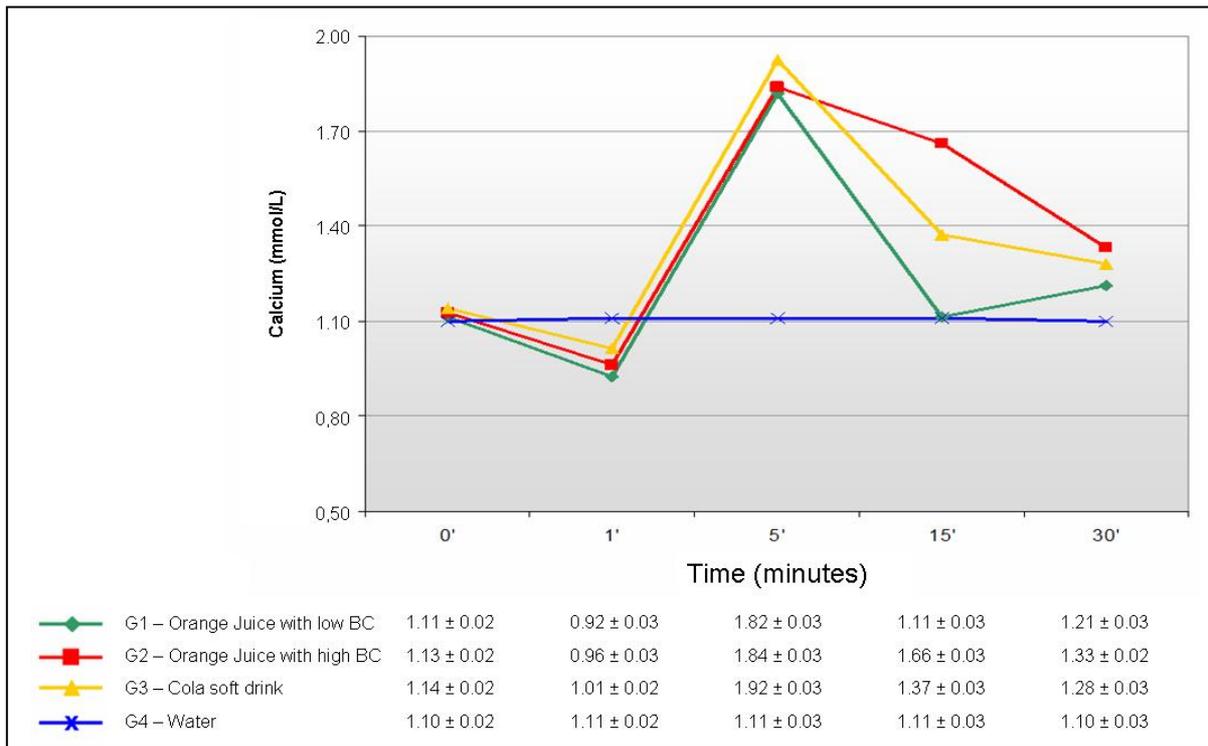


Figure 2. Mean variation of salivary calcium quantity ( $\pm$  error) after the ingestion of experimental beverages according to the time intervals.

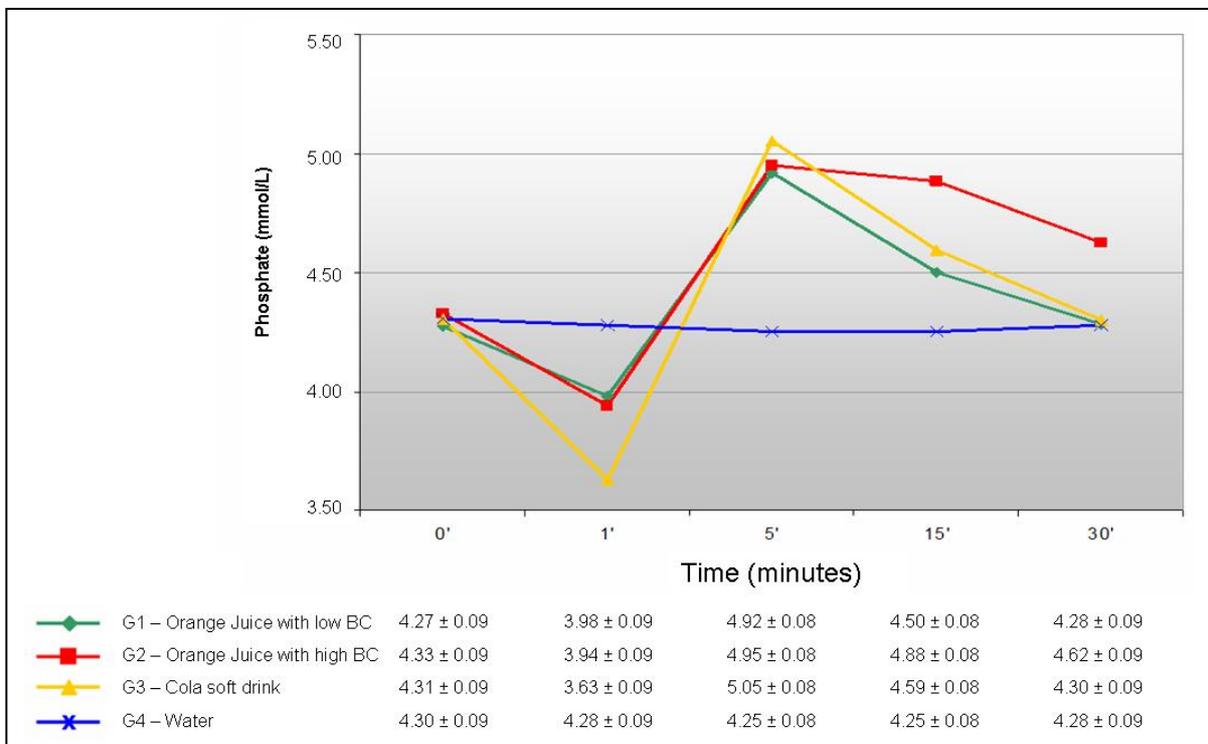


Figure 3. Mean variation of salivary phosphate quantity ( $\pm$  error) after the ingestion of experimental beverages according to the time intervals.

## DISCUSSION

In the study of dental erosion, it is important to verify the characteristics of the beverages, the method of ingestion and individual's factors, especially, those related to salivary properties [17,18]. In the present study it was observed that some factor influenced the salivary pH during the ingestion of acid products.

Salivary flow and buffer capacity influence the development of erosive lesions due to eliminating and neutralizing the oral cavity acids. These characteristics, as well as pH and calcium and phosphate concentration, vary according to the person, the period of the day and the day on which saliva is collected [9].

Considering buffer capacity, there were significant differences among the 34 participants. Nevertheless, mean values similar to those found by Sánchez and Preliasco [14], showed that the majority of healthy children presented a medium to high capacity of maintaining neutral salivary pH. According to O'Sullivan and Curzon [17], people free of oral pathologies have a higher buffer capacity, while those with dental erosion have reduced buffer capacity. The authors also related that buffer capacity is directly influenced by the existing amounts of calcium and phosphate in oral fluids, characteristics that are accentuated with age. In the present study, a positive correlation between buffer capacity and amount of calcium and phosphate was found in the salivary samples. For Bardow et al. [19] and Jensdottir et al. [20], salivary buffer capacity has a higher protective effect than salivary flow. This is different in caries lesions, in which salivary flow is more important.

Taking into account the mean salivary pH value of the evaluated children, a range from 6.5 to 7.5 was considered normal for human beings [13, 20], and was also similar to findings of studies involving children of the same age [11, 12, 14, 17]. The pH value at which the hydroxyapatite crystals begin to dissolve is considered as the critical pH for dental demineralization. Because children have a lower calcium concentration than adults, their critical pH is around 6.0 [11].

The experimental beverages used in the present study, with the exception of water, were able to significantly reduce the salivary pH from a neutral rate to values below the critical standard. The most expressive fall was caused by the cola soft drink, which had a lower endogenous pH than the juices, and reduced

the salivary pH from 7.24 to 5.41. After 5 minutes, all the groups presented values higher than 6.0, but still different from the initial pH. After 15 minutes, only the juice with high buffer capacity had not been neutralized, which occurred at the time of 30 minutes. This period for pH recovery was also observed in the studies of Meurman et al. [21], Bashir and Lagerlöf [13], Millward et al. [22], Azrak et al. [12], Sánchez and Preliasco [14], Bainghton et al. [23], Jensdottir et al. [20]. Data from the majority of the researches are derived from adults, and according to Anderson, Hector and Rampersad [11], in children these indices would probably take more time to be restored. This suggested that erosion risk in children is greater than in adults, according to Hunter et al. [24,25].

Together with the decline in salivary pH, an immediate reduction in the concentration of calcium and phosphate was observed, which resulted in sub-saturated saliva in comparison with mineralized dental tissues. With the salivary pH below the critical value for demineralization, the dissolution of hydroxyapatite crystals occurred in order to neutralize the acidity. However, 5 minutes after the ingestion of acid beverages, an increase in salivary calcium and phosphate concentration was verified, as well as, the pH return to the initial neutrality. Saliva began to be supersaturated, making calcium and phosphate gradually return to the teeth, resulting in remineralization. The time for this recovery varied significantly among the experimental groups due to the characteristics inherent to the beverages, specially, their buffer capacities.

In the same manner that the salivary buffers are responsible for maintaining the pH near neutrality, the beverage buffers retained their acid endogenous pH in the present study. Therefore, a dispute occurs between these buffers, which results in different neutralization times for salivary pH and in direct repercussion on salivary calcium and phosphate saturations. According to Larsen e Nyvad [26], a beverage with high buffer capacity is able to produce erosive lesions similar to those produced by a beverage with a pH one point lower. Consequently, it was verified that the juice with the higher buffer capacity was the one that kept the saliva acid for a longer period, and even 30 minutes after its ingestion, the salivary calcium and phosphate levels had not yet normalized, which represent an extra risk of dental erosion.

Moreover, the chemical characteristics of the acid product mixed with salivary functions provided varied salivary stimulus. The citric acid component of

orange juices exerted a more intense gustatory stimulus that accelerated self cleaning of the oral cavity [27,28]. But this acid presented a chelating effect, which modified the *in vivo* erosive process by the interaction with saliva or direct dissolution of dental minerals [29].

Treatments that acted more directly on these characteristics, stimulating the increase of calcium in the saliva, or in the acid beverages and reducing their buffer capacity, could minimize the erosive potential and make the pH less fluctuant and to return rapidly to neutrality [30].

## CONCLUSIONS

- The three beverages that presented acid pH (orange juices and soft drink) were able to significantly modify the studied salivary properties, reducing the pH and altering the calcium and phosphate saturations.
- The soft drink was the beverage that caused the most significant drop in salivary pH. The orange juice with high buffer capacity was the beverage that kept saliva acid for the longest time and it was also the only beverage that caused the calcium and phosphate saturations not to return to normality.
- Considering the acid beverages evaluated, the orange juice with low buffer capacity was the beverage with least erosive potential followed by the soft drink and by the orange juice with high buffer capacity.

## REFERENCES

31. Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-155.
32. Jones SG, Nunn JH. The dental health of 3-year-old children in East Cumbria 1993. *Community Dent Health* 1995; 12: 161-166.
33. Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R. The relationship between erosion caries and rampant caries, and dietary habits in preschool children in Saudi Arabia. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 430-439.

34. Harding MA, Whelton H, O'Mullane DM et al. Dental erosion in 5-year-old Irish school children and associated factors: a pilot study. *Community Dent Health* 2003; 20: 165-170.
35. Wiegand A, Müller J, Werner C et al. Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German Kindergarten Children. *Oral Diseases* 2006; 12: 117-124.
36. Peres KG, Armênio MF, Peres MA et al. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. *Int J Paed Dent* 2005, v. 15, p. 249-255.
37. Al-Majed I, Maguire A, Murray JJ. Risk factors for dental erosion in 5-6 year old and 12-14 year old boys in Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 38-46.
38. Jaeggi T, Lussi A. Erosion in early school-age children. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2004; 114: 876-881.
39. Lussi A; Jaeggi T; Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 34-44.
40. West NX, Maxwell A, Hughes JA, et al. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998; 26: 329-335.
41. Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 266-273.
42. Azrak B, Callaway A, Knözinger S, et al. Reduction of the pH-values of whole saliva after the intake of apple juice containing beverages in children and adults. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1:229-236.
43. Bashir E, Lagerlöf F. Effect of citric acid clearance on the saturation with respect to hydroxiapatita in saliva. *Caries Res* 1996; 30: 213-217.
44. Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 251-257.
45. Attin T, Becker K, Hannig C et al. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005; 39: 432-436.
46. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-380.
47. O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000; 34: 82-87.
48. Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 484-489.
49. Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B et al. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. *Caries Res* 2003; 37: 232-236.
50. Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C et al. Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries Res* 2005; 39: 468-474.
51. Meurman JH, Rytömaa I, Kari K et al. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 1987; 21: 353-359.
52. Millward A et al. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res* 1997;31: 44-49.
53. Bainghton B, Brailsford SR, Gilbert SC, et al. Intra-oral acid production associated with eating whole or pulped raw fruits. *Caries Res* 2004; 38: 341-349.

54. Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent* 2000; 28: 257-263.
55. Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent* 2000; 28: 265-270.
56. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81-87.
57. Lussi A; Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000; 34: 182-187.
58. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA et al. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35: 211-215.
59. Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:199-206.
60. Zero DT, Lussi A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.



Abrahamsen TC. The worn dentition – pathognomonic patterns of abrasion and erosion. *Int Dent J* 2005, 55: 268-276.

Addy M. Tooth brushing, tooth wear and dentin hypersensitivity – are they associated? *Int Dent J* 2005; 55: 261-267.

Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R. The relationship between erosion caries and rampant caries, and dietary habits in preschool children in Saudi Arabia. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 430-439.

Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R. Erosion, caries and rampant caries in preschool children in Jeddah, Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 16-23.

Al-Majed I, Maguire A, Murray JJ. Risk factors for dental erosion in 5-6 year old and 12-14 year old boys in Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 38-46.

Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paed Dent* 2001; 11: 266-273.

Attin T, Becker K, Hannig C et al. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005; 39: 432-436.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Diseases*, 2005; 11:7-12.

Azrak B, Callaway A, Knözinger S, et al. Reduction of the pH-values of whole saliva after the intake of apple juice containing beverages in children and adults. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 229-236.

Baington B, Brailsford SR, Gilbert SC, et al. Intra-oral acid production associated with eating whole or pulped raw fruits. *Caries Res* 2004; 38: 341-349.

Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relations between medications intake, complaints of dry mouth, saliva flow rate, saliva composition and the rate of human tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* 2001; 46:413-423.

Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B et al. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. *Caries Res* 2003; 37: 232-236.

Bashir E, Lagerlöf F. Effect of citric acid clearance on the saturation with respect to hydroxyapatite in saliva. *Caries Res* 1996; 30: 213-217.

Carey CM, Vogel GL. Measurement of calcium activity in oral fluids by ion selective electrode: method evaluation and simplified calculation of ion activity products. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 2000; 105: 267-273.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157: 375-380.

Costa CC, Almeida ICS, Costa-Filho LC. Erosive effect of an antihistamine-containing syrup on primary enamel and its reduction by fluoride dentifrice. *Int J Paed Dent* 2006. 16:174-180.

Crains AM. The pH and titratable acidity of a range of diluting drinks and their potential effect on dental erosion. *J Dent* 2002; 30: 313-317.

Dynesen AW et al. Oral findings in anorexia nervosa and bulimia nervosa with special reference to salivary changes. *Oral Biosci Med* 2004; 1: 151-169.

Edwards M et al. Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. *J Oral Rehabil* 1999; 12: 923-927.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA et al. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35: 211-215.

Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents – a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2001; 29: 264-271.

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures of erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001; 35:325-330.

Grenby TH et al. Laboratory studies of the dental properties of soft drinks. *Br J Nutr* 1989; 62: 451-464.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001; 35: 142-148.

Harding MA, Whelton H, O'Mullane DM et al. Dental erosion in 5-year-old Irish school children and associated factors: a pilot study. *Community Dent Health* 2003; 20: 165-170.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralisation (part 1). *J Clin Paed Dent* 2003; 28:47-52.

Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent* 2000; 28: 257-263.

Hunter ML, West NX, Hughes JA, et al. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent* 2000; 28: 265-270.

Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-155.

Jaeggi T, Lussi A. Erosion in early school-age children. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2004; 114: 876-881.

Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C et al. Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries Res* 2005; 39: 468-474.

Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 484-489.

Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth – an in vivo and in vitro study. *J Dent* 2001; 29: 333-340.

Jones SG, Nunn JH. The dental health of 3-year-old children in East Cumbria 1993. *Community Dent Health* 1995; 12: 161-166.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81-87.

Lussi A; Jaeggi T; Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 34-44.

Lussi A; Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000; 34: 182-187.

Meurman JH, Rytömaa I, Kari K et al. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 1987; 21: 353-359.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:199-206.

Millward A et al. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res* 1997;31: 44-49.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000a; 34: 82-87.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000b; 67: 186-192.

Patussi EG. Avaliação da dureza do esmalte de dentes decíduos, expostos a dois sucos de laranja industrializados: estudo in vitro. Dissertação de Mestrado. Florianópolis: Faculdade de Odontologia da UFSC; 2003.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases* 2002; 8:117-129.

Peres KG, Armênio MF, Peres MA et al. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. *Int J Paed Dent*, v. 15, p. 249-255.

Pontefract H, Hughes J, Kemp KH, et al. The erosive effects of some mouthrinses on enamel. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 319-324.

Sánchez GA, Preliasco MVF. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 251-257.

Shaw L, O'Sullivan E. Diagnosis and prevention of dental erosion in children. *Int J Paediatr Dent*, 2000; 10: 356-365.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000; 50:140-161.

Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 82-86.

Vogel A. *Análise Química Quantitativa*. 6ª Ed. LTC 2002; Cap.17: 351-385.

West NX, Maxwell A, Hughes JA, et al. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998; 26: 329-335.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent of plaque calcium concentrations. *Caries Res*, 2002; 36: 256-265.

Wiegand A, Müller J, Werner C et al. Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German Kindergarten Children. *Oral Diseases* 2006; 12: 117-124.

Zero DT, Lussi A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.





UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

DIVISÃO DE PESQUISA – VRPPG

Comitê de Ética em Pesquisa

CAMPUS I - Km 171 - BR 285, Bairro São José, Caixa Postal 611  
CEP 99001-970 Passo Fundo/RS - Fone (54) 316-8370 / Fax (54) 316-  
8372  
cep@upf.br

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 27/09/06, analisou o projeto de pesquisa “**Avaliação do pH, capacidade tampão, fluxo e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças após ingestão de sucos de laranja industrializados e refrigerante tipo cola**”, registro no CEP 217/2006 do pesquisador **Eduardo Grigollo Patussi**.

O projeto tem como objetivo avaliar por meio de análises bioquímicas, as modificações que ocorrem na saliva de crianças de 6 a 8 anos de idade, após a ingestão de bebidas com potencial erosivo distintos. Para isto, o pesquisador realizará um estudo experimental com crianças atendidas na Clínica de Odontopediatria I e II da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. Os direitos fundamentais dos participantes da pesquisa são garantidos no protocolo e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que será obtido dos pais ou responsáveis pelas crianças. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada.

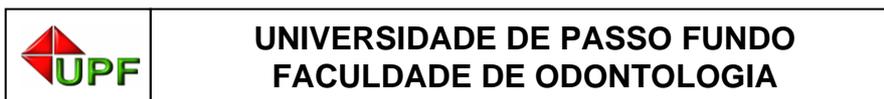
Após análise o projeto foi considerado relevante e claro em seus aspectos metodológicos. Em relação aos aspectos éticos o Comitê houve por bem **APROVAR** o protocolo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentados por estarem em conformidade com a Resolução CNS-MS 196/96 e suas complementares.

O pesquisador deverá apresentar relatório ao CEP ao final do estudo.

Passo Fundo, 13 de outubro de 2006.

  
**Prof. Sérgio Machado Porto**  
Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa  
VRPPG - UPF





## **Caros Pais.**

Meu nome é Eduardo G. Patussi, sou professor da disciplina de Odontopediatria da Universidade de Passo Fundo e estou finalizando o curso de Doutorado na Universidade Federal de Santa Catarina.

Meu trabalho final (tese) objetiva identificar o que o suco de laranja e um refrigerante causam na cavidade bucal, mais especificamente na saliva das crianças, logo após sua ingestão. E qual a importância disso? Por que estudar isso?

Muitas crianças, hoje em dia, têm apresentado lesões ou desgastes nos dentes em decorrência do consumo excessivo de refrigerantes e de sucos de frutas. Essas lesões são diferentes da cárie. Elas acontecem mesmo que a criança tenha uma escovação perfeita. Essas lesões são conhecidas como erosão dentária.

Os refrigerantes e sucos de laranja evidenciam-se entre os principais causadores da erosão dentária, além de constarem entre as bebidas mais consumidas no mundo, desde os primeiros anos de vida. Por isso, estou pesquisando esse tema, para que se possa identificar e apontar as melhores soluções, desde a prevenção ao tratamento para essas lesões.

Nesse sentido, seu filho pode participar desta pesquisa e colaborar para o desenvolvimento científico da Odontologia e da saúde humana. Em anexo, estou enviando um documento denominado “Consentimento Livre e Esclarecido”, no qual estão explicados os objetivos, a metodologia, os riscos e os benefícios da pesquisa, através do qual os senhores poderão consentir a participação do seu filho(a) na pesquisa.

Atenciosamente e grato por sua colaboração.

Passo Fundo, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

*Eduardo G. Patussi*

## Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado Pai / Mãe / Responsável Legal

O seu filho está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua, e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma.

### 1. Informações sobre a pesquisa:

Título da Pesquisa: “Avaliação do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças após a ingestão de sucos de laranja industrializados e refrigerante tipo cola: estudo *in vivo*”.

Pesquisador responsável: Eduardo Grigollo Patussi

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):

(54) 9951-xxxx (Celular) / 3311-xxxx (Consultório) / 3316-8402 (Faculdade de Odontologia da UPF) / 3313-xxxx (Residencial).

Email: [epatussi@upf.br](mailto:epatussi@upf.br)

### 2. Objetivo principal

Este estudo tem por objetivo avaliar o comportamento do pH, da capacidade tampão e da quantidade de cálcio e de fosfato salivar de crianças, de seis a oito anos de idade, após a ingestão de dois sucos de laranja industrializados com diferentes capacidades tampão e um refrigerante tipo cola. Como controle será utilizada água mineral sem gás.

### 3. Justificativa

Os sucos de laranja e os refrigerantes constam entre as bebidas mais consumidas mundialmente, muitas vezes já no primeiro ano de vida. São bebidas ácidas que, se ingeridas em excesso, podem causar erosão dentária.

A erosão é caracterizada por um desgaste nas estruturas dentárias, ocasionada quando o meio bucal permanece freqüentemente ácido. Essa acidez é proveniente, na maioria das vezes, dos alimentos, como refrigerantes e sucos de frutas. Importante salientar que as lesões erosivas ocorrem independentemente da presença de bactérias, de modo que, mesmo com hábitos de higiene bucal adequados, os dentes podem desmineralizar.

Em virtude disso, estudos que objetivam elucidar os fatores envolvidos nos processos erosivos tornam-se necessários e muito importantes.

#### 4. Procedimentos

Inicialmente, será realizado um exame clínico odontológico, na Clínica de Odontologia da UPF, situada na Escola Estadual Monteiro Lobato. Após, as crianças serão convidadas a retornar à clínica para a realização da pesquisa, a qual será feita em quatro diferentes dias, nos quais ela irá ingerir 250 mL de uma das bebidas utilizadas no experimento: suco de laranja (duas marcas comerciais – SUVALAN® e ADES®), refrigerante tipo cola (COCA-COLA®) e água mineral sem gás (NESLÉ®).

Em cada dia, serão feitas coletas da saliva – antes da ingestão, logo em seguida e decorridos 5, 15 e 30 minutos. Com a saliva coletada, serão analisados o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio e de fosfato. Todo o material coletado será descartado imediatamente após os exames.

Poderá ser solicitado aos pais, ou responsáveis legais, autorização para fotografar a região bucal da criança, de modo que só os dentes apareçam, sem identificação da mesma, para fins de produção de trabalhos científicos, apresentação em eventos ou como material didático nos Cursos de Odontologia,

#### 5. Desconfortos e/ou riscos esperados

Não há riscos previstos, uma vez que os exames serão realizados dentro das normas de biossegurança e dos padrões de consumo normal das bebidas.

#### 6. Benefícios do experimento

Os responsáveis serão informados sobre a condição bucal de seus filhos, e aquelas crianças que apresentarem lesões erosivas serão encaminhadas para atendimento odontológico, bem como receberão orientações sobre medidas de prevenção para o controle dessa doença.

## 7. Retirada do consentimento

Os responsáveis legais das crianças participantes deste estudo terão a liberdade de retirar o consentimento assinado a qualquer momento, deixando a criança de participar do estudo, sem qualquer represália ou prejuízo.

## 8. Consentimento livre e esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_ (R.G. \_\_\_\_\_),  
responsável legal por \_\_\_\_\_ (R.G. \_\_\_\_\_),  
concordo com a participação de meu filho(a) no estudo “Avaliação do pH, capacidade tampão e conteúdo de cálcio e fosfato salivar em crianças após a ingestão de sucos de laranja industrializados e refrigerante tipo cola: estudo *in vivo*”, autorizando-o a contribuir com o estudo, que será executado pelo doutorando Eduardo Grigollo Patussi, aluno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida, bem como autorizo a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de sua identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos dessa Universidade. Também consinto a realização de fotografias da região bucal, sem identificação do meu filho(a), para utilização como material didático para aulas expositivas, apresentação em eventos científicos ou para publicação de artigo em revista científica da área da saúde, nacional e/ou internacional.

Passo Fundo, ..... de ..... de 200.....

---

Assinatura

