

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Jaqueline Maria Brandão Rizzato

**ESTUDO PILOTO SOBRE CARACTERIZAÇÃO
DA SALIVA DE PACIENTES FUMANTES POR
ESPECTROSCOPIA FT-IR**

Taubaté – SP
2019

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Jaqueline Maria Brandão Rizzato

ESTUDO PILOTO SOBRE CARACTERIZAÇÃO
DA SALIVA DE PACIENTES FUMANTES POR
ESPECTROSCOPIA FT-IR

Trabalho de Conclusão de curso apresentado para obtenção do Grau bacharel pelo Curso de Odontologia no Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. Luís Felipe C S de Carvalho

Taubaté – SP
2019

SIBi - Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU

R627e Rizzato, Jaqueline Maria Brandão
Estudo piloto sobre caracterização da saliva de pacientes fumantes
por espectroscopia FT-IR / Jaqueline Maria Brandão Rizzato. – 2019.
38f. : il.

Monografia (graduação) – Universidade de Taubaté, Departamento
de Odontologia, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho,
Departamento de Odontologia.

1. Biomarcadores. 2. Câncer bucal. 3. Espectroscopia FTIR. 4.
Fumantes. 5. Saliva. I. Universidade de Taubaté. II. Título.

CDD 617.607

JAQUELINE MARIA BRANDÃO RIZZATO
ESTUDO PILOTO CARACTERIZAÇÃO DA SALIVA POR ESPECTROSCOPIA FT-IR

Trabalho de Conclusão de curso apresentado para obtenção do Grau bacharel pelo Curso de Odontologia no Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. Luís Felipe C S de Carvalho

Data: 26/11/2019

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Felipe C S de Carvalho / Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Prof. Dr. Rubens Guimarães Filho / Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Prof. Dr. Rayssa Ferreira Zanatta/ Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Suplentes

Prof. Dr. Monica Patrocínio / Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Dedico este trabalho a Rosangela,

A minha mais fiel colaboradora

Aos meus Familiares, Laercio,

Luiz Felipe e Bruno.

AGRADECIMENTO

Agradeço este trabalho a todos da minha família que me ajudaram a prosperar e a ter forças para sempre seguir em frente, agradeço especialmente a minha mãe a maior guerreira deste universo e que sempre me apoiou em tudo, agradeço também a minha amada vó que me olhou de lá de cima e me fez seguir, também a todos os funcionários e corpo docente da universidade de Taubaté por todo o apoio, ao meu orientador por toda ajuda e aos membros do meu grupo de pesquisa.

RESUMO

Os estudos *ex-vivo* envolvendo a utilização da espectroscopia FT-IR em processos patológicos de origem bucal estão entre os que obtiveram resultados particularmente relevantes. O fato de o ambiente oral ser de fácil acesso possibilita o emprego desta técnica para experimentos *in vivo*, e a utilização da saliva como biomarcadores de fácil coleta e análise vem se destacando. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é utilização da espectroscopia FT- IR para o estudo da saliva envolvendo pacientes fumantes, de modo que os espectros obtidos em tempo real e de maneira não invasiva possam fornecer importantes informações das alterações bioquímica. Para a obtenção das amostras coletamos saliva de 13 pacientes através da técnica de expectoração e analisamos no espectrômetro, após isto usamos o software Matlab para obtermos os gráficos. Nos Resultados preliminares encontramos diferenciação em quatro bandas de Fingerprint (Impressão digital dos Espectros). As bandas onde localizamos foram a de 1610 cm^{-1} (Adenina) e 1634 cm^{-1} (Uracila) no grupo de pacientes fumantes e 1590 cm^{-1} (Alongamento de anel de C-C de fenil) e 1623 cm^{-1} (Ácido nucleico) no grupo de pacientes controle. Concluimos então que obtivemos bandas de diferenciação entre a saliva do grupo controle e do grupo de fumantes, podendo se estender para outro trabalho onde salientaremos a técnica

Palavras chaves: Saliva, biomarcadores, espectroscopia FT-IR, câncer bucal fumantes

ABSTRACT

Ex vivo studies involving the use of FT-IR spectroscopy in pathological processes of oral origin are among those that obtain relevant results. The fact that the oral environment is easily accessible allows the use of this technique for in vivo experiments, and the use of saliva as biomarkers for easy collection and analysis has been highlighted. In this context, the objective of this research is to use FT-IR spectroscopy to study saliva of cancer patients, so that the spectra are verified in real time and noninvasively, using as useful information on biochemistry. For use as saliva samples collected from 13 patients using sputum techniques and spectrometer analysis, after this use of Matlab software to obtain the graphs. Preliminary results detected a difference in four fingerprint bands (Spectrum Fingerprint). As bands where we located 1616 cm⁻¹ (Adenine) and 1634 cm⁻¹ (Uracila) in the smoking patient group and 1590 cm⁻¹ (CC phenyl ring elongation) and 1623 cm⁻¹ (nucleic acid) no patient group control. He concluded that he obtained differentiation bands between the saliva of the control group and the group of smokers, and could become a beautician for another work where he is highlighted as a technique.

Keywords: Saliva, biomarkers, FT-IR spectroscopy, oral cancer, smokers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tubo de coleta das amostras

Figura 2 – Armazenamento das amostras

Figura 3 – Espectrômetro Agilent ATR-FTIR

Figura 4 – Gráfico de demonstração

Figura 5 – Espectro médio + desvio padrão

Figura 6 – Gráfico dos Espectros obtidos

Figura 7 – Loadingplot PC3 (Abaixo da linha observamos o grupo C e acima o grupo F)

Figura 8 – Scattering plot PC2 x PC3

Figura 9 – Artigo com as bandas descritas pelo Movasagui

Figura 10 – Espectro médio da segunda derivada da região alto número de ondas

Figura 11 – Espectro médio da segunda derivada fingerprint

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR – Attenuated Total Reflection

FT – Fourier Transform

IR – Infrared

LEVB – Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica

PCs – Componentes Principais

PCA – Principal Components Analysis

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	10
<u>2</u>	<u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	12
<u>2.1</u>	<u>SALIVA</u>	12
<u>2.2</u>	<u>CÂNCER BUCAL</u>	13
<u>2.3</u>	<u>ESPECTROSCOPIA FT-IR</u>	15
<u>2.3.1</u>	<u><i>Biópsia óptica</i></u>	15
<u>3</u>	<u>PROPOSIÇÃO</u>	18
<u>4</u>	<u>METODOLOGIA</u>	19
<u>4.1</u>	<u>AMOSTRAGEM</u>	19
<u>4.2</u>	<u>CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO</u>	19
<u>4.3</u>	<u>COLETA</u>	20
<u>4.4</u>	<u>ESPECTROSCOPIA FT-IR</u>	21
<u>4.5</u>	<u>ANÁLISE DE DADOS</u>	22
<u>4.5.1</u>	<u><i>Análise dos espectros</i></u>	22
<u>4.5.2</u>	<u><i>Pré-processamento dos dados espectrais</i></u>	22
<u>4.5.3</u>	<u><i>Classificação dos espectros – Análises estatísticas</i></u>	23
<u>5</u>	<u>RESULTADOS</u>	24
<u>6</u>	<u>DISCUSSÃO</u>	28
<u>7</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	30
	<u>REFERÊNCIAS</u>	31

1 INTRODUÇÃO

Estudos com a saliva tem sido realizado para detectar biomarcadores que podem diagnosticar doenças sistêmicas não só na cavidade oral, mas no corpo inteiro. A saliva tem várias vantagens ao serem analisadas, como sua coleta rápida e pouco invasiva para o paciente, pois a maioria dos métodos para o diagnóstico de doenças na cavidade oral usa a técnica de biópsia que se torna invasiva para o paciente e tem seu procedimento prolongado. As desvantagens do uso da saliva é que as técnicas usadas para o diagnóstico de biomarcadores levam certo tempo para que o resultado seja processado e cheguem até o cirurgião dentista. Se caso o exame solicitado seja para o diagnóstico de câncer bucal, quanto mais rápido o exame solicitado tiver seu resultado, melhor o prognóstico e o tratamento de cada paciente (Yakob *et al*, 2014).

O câncer bucal é responsável de 2% a 4% de todos casos relatados no mundo de canceres em geral, tendo em vista que a taxa de sobrevida destes pacientes tende a ser de 5 anos em 60% a 80% dos casos quando detectados em estágios avançados, sendo decorrente do potencial invasivo deste canceres (Yakob *et al*, 2014). Esta doença tem um índice de acometimento maior em homens do que as mulheres pois os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença é o fumo combinado com o excesso de bebida alcoólica e a principal faixa etária é acima dos 40 anos de idade, podendo estar relacionado a mudanças do organismo humano (Brener *et al*, 2007, Bulgareli *et al*, 2013).

Há também fatores extrínsecos ou ambientais e intrínsecos que podem facilitar a instalação da doença. Os fatores extrínsecos envolvem tabagismo, etilismo, dietas pobres em vegetais, exposição à luz ultravioleta, infecção viral, má-higiene bucal. Os intrínsecos são referentes ao indivíduo como idade, raça, sexo, mutações espontâneas e/ou herdadas. (Melo *et al*, 2010)

O diagnóstico tardio das lesões bucais malignas torna o tratamento mais difícil, caro e compromete o prognóstico. O exame histopatológico realizado através da análise tecidual, obtido por biópsia excisional ou incisional, é considerado como padrão ouro do diagnóstico (Carvalho *et al*, 2010). A biópsia é um dos métodos de diagnóstico mais utilizado atualmente, entretanto este procedimento tem como desvantagem a invasividade em decorrência da necessidade de cirurgia, o que gera morbidade pós-operatória (Werner *et al*, 2009).

Os biofluidos, como saliva, podem ser uma alternativa para esse tipo de diagnóstico, pois através deste fluido biológico, podem ser detectados diversos tipos de biomoléculas responsáveis pela organização funcional do organismo. A saliva é um líquido secretado por glândulas salivares diretamente na cavidade bucal. Seu maior componente é a água, que chega a ocupar aproximadamente 99% de seu peso, sendo o restante formado por componentes orgânicos e minerais que constituem sua parte (Pinheiro *et al*, 2000).

A saliva é rica em grupos de constituintes proteicos e não proteicos com o propósito de manter a saúde da cavidade bucal, com isto, este arsenal possui um potencial de informações para diagnóstico de doenças sistêmicas (Lima *et al*, 2014). Este fluido biológico está se tornando uma ferramenta cada vez mais atraente devido aos avanços em novas tecnologias e seu potencial para verificação da saúde e das doenças em geral. Uma tecnologia sensível é necessária para detectar biomarcadores fazendo com que a saliva seja um diagnóstico eficaz.

Para análise desse biofluidos, estudos com a espectroscopia FT-IR vem se aprofundando no meio clínico, podendo ser considerada uma potente ferramenta de diagnóstico se comparada a outras técnicas, pois requer uma pequena quantidade de amostra para ser analisada e pode ser feito o exame em diferentes formas e estados físicos, não exigindo qualquer tipo de corante ou fixação.

A aquisição dos espectros ocorre em apenas alguns segundos e desta forma pode-se obter uma análise completa das alterações causadas pelos processos patológicos de maneira rápida e não subjetiva, ocasionando então para o paciente um prognóstico melhor e um tratamento menos invasivo (Petibois *et al*, 2006) Por conseguinte, a possibilidade de gerar um rápido diagnóstico e de forma indolor através das amostras salivares seria um avanço de grande magnitude para detectar os espectros que apontariam biomarcadores para malignidade dentro da cavidade bucal, otimizando o tratamento e melhorando o prognóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Saliva

A saliva é um líquido secretado por glândulas salivares diretamente na cavidade bucal. Seu maior componente é a água, que chega a ocupar aproximadamente 99% de seu peso, sendo o restante formado por componentes orgânicos e minerais que constituem a parte sólida da saliva. Este biofluido é importante para o meio bucal e um dos seus principais papéis é o auxílio na digestão e excreção. Ela contém a enzima amilase, capaz de hidrolisar o amido contido nos alimentos, transformando em dextrina, maltose e glicose (Pinheiro *et al*, 2000). A saliva é rica em grupo de constituintes proteicos e não proteicos com o propósito de manter a saúde da cavidade oral e com isto, este arsenal possui um potencial de informações para diagnóstico de doenças sistêmicas (Lima *et al*, 2014).

A saliva humana é produzida por diversas glândulas da cavidade oral. A taxa de produção por minuto de saliva é de aproximadamente 0,5 ml em adultos saudáveis, embora possa variar de acordo com a estimulação, mastigação e atividade física. É composta por água, eletrólitos, proteínas e compostos biológicos e inorgânicos. O mapeamento salivar através da espectroscopia pode avaliar múltiplos espectros sendo os mais proeminentes os aminoácidos (Muro *et al*, 2016).

O método mais utilizado com saliva durante muito tempo foi o monitoramento do risco de cárie para avaliação microbiológica. Estudos com a saliva tem sido realizado para detectar biomarcadores que podem diagnosticar doenças sistêmicas não só na cavidade oral, mas no corpo inteiro. A saliva tem várias vantagens ao ser analisada, como sua coleta rápida e não invasiva para o paciente, pois a maioria dos métodos para o diagnóstico de doenças na cavidade oral usa a técnica de biópsia que se torna invasiva para o paciente e tem seu procedimento prolongado. As desvantagens do uso da saliva é que as técnicas usadas para o diagnóstico de biomarcadores levam certo tempo para que o resultado seja processado e cheguem até o cirurgião dentista. Se caso o exame solicitado seja para o diagnóstico de câncer bucal, quanto mais rápido o exame solicitado tiver seu resultado, melhor o prognóstico e o tratamento de cada paciente (Yakob *et al*, 2014).

2.2 Câncer Bucal

O câncer bucal é uma doença crônica que provoca perda funcional local em decorrência da agressão progressiva. Por ser uma desordem que ocorre muitas vezes com ausência de sintomatologia dolorosa, a auto percepção do paciente é retardada e também o seu diagnóstico e início do tratamento. A estimativa anual para os novos casos de câncer bucal descrita pelo INCA foi de 14.700, sendo 11.200 homens e 3.500 mulheres (2018 - INCA), e a estimativa de morte ocasionada pelo câncer bucal foi de 5.401, sendo 4.223 homens e 1.178 mulheres na pesquisa realizada em 2012 (Costa et al, 2015).

A urbanização e o desenvolvimento tecnológico expõem a população a fatores de risco para o câncer. A grande prevalência desta doença está relacionada a agentes físico-químicos com potencial mutagênico como os aditivos alimentares, pesticidas, álcool, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, níquel, asbesto, poluição ambiental e o fumo. A combinação do tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas é a causa de 90% das neoplasias bucais. Os grupos de risco têm relação com os fatores citados acima assim como a exposição aos raios ultravioletas (UV) (Leite et al, 1998; Volkweis et al, 2014).

O cirurgião-dentista é o primeiro profissional apto a realizar a detecção de lesões orais, uma vez que é de sua competência o exame minucioso da cavidade bucal. A inspeção de todas as estruturas bucais, aliada à palpação de linfonodos da região de cabeça e pescoço, representa um recurso semiotécnico de importância indiscutível na exploração de lesões que podem acometer a boca. Tais exames clínicos podem fornecer evidências da presença do câncer bucal, com isto a importância de serem desenvolvidas com perícia pelo cirurgião-dentista, não devendo jamais ser negligenciadas. O câncer bucal pode ser facilmente detectado através de exames relativamente simples e o prognóstico da doença está ligado à fase em que ela é detectada (Pinheiro et al, 2000).

O método atual de diagnóstico de câncer bucal depende muito da capacidade do profissional em realizar o reconhecimento das alterações neoplásicas mínimas de forma visual e encaminhar para o exame histopatológico. Porém, discernir malignidade entre lesões realmente com potencial maligno de condições inflamatórias benignas comuns é complexo, mesmo por profissionais experientes (Nagi et al, 2016).

Os processos patológicos geram mudanças complexas a nível celular e são desafiadores quanto ao estudo das bases bioquímicas e fisiológicas em decorrência do seu mecanismo nas vias de propagação. Quando uma patologia se inicia, há possibilidade de alteração dos elementos estruturais das células, bem como seu estado fisiológico e regulação metabólica. Dentro das células é encontrado o protoplasma formado por diversas organelas concomitantes com água, minerais e diversas macromoléculas. Quando há a análise das interações entre estes diversos componentes, podemos evidenciar as características fisiológicas das células (Carvalho, *et al* 2012).

O estudo das interações bioquímicas da composição entre as diversas macromoléculas e organelas celulares, armazenamento, síntese, interações e degradações é a base dos processos fisiológicos e patológicos. Em decorrência destes aspectos, é possível que a análise dos espectros provenientes das técnicas de espectroscopia possa ser útil para o diagnóstico precoce das alterações potencialmente cancerizáveis encontrados na cavidade bucal (Carvalho et al, 2012).

O carcinoma espinocelular de boca é a neoplasia maligna mais comum com prevalência de 95% entre os outros tipos de lesões malignas oriundas da cavidade bucal. Atualmente a sua detecção baseia-se em exame clínico completo combinado com biópsia para análise histológica. A maioria dos casos não é detectada até que o câncer se desenvolva em estágios avançados; assim, um marcador diagnóstico confiável de estágio inicial é necessário (Yacob et al, 2014; Peisker et al, 2017).

Embora a cavidade bucal seja facilmente acessível para o exame visual direto, a maioria dos pacientes com carcinoma de células escamosas está em estágio avançado, o que se acredita ser a principal razão para a baixa taxa de sobrevivência de cerca de 50 a 63%. Por outro lado, os cânceres bucais precoces costumam ser altamente curáveis, com menos morbidade do que os cânceres que estão em estágios posteriores. Essas estatísticas enfatizam a importância da detecção precoce e precisa pelos clínicos. Em resposta à necessidade de detecção precoce do câncer bucal, vários adjuvantes diagnósticos foram desenvolvidos, incluindo o uso de biomarcadores salivares. A coleta de saliva é um procedimento relativamente simples e não invasivo comparado à biópsia (Peisker et al, 2017)

2.3 Espectroscopia FT-IR

2.3.1 Biópsia óptica

As técnicas de biópsia óptica referem-se principalmente a técnicas espectroscópicas como espectroscopias FT-IR, Raman, Fluorescência, tomografia de coerência óptica, dicroísmo circular, entre outras utilizadas como ferramentas para sondar os possíveis estados patológicos de um tecido a partir do estudo da interação entre a luz e o material biológico (Prasad, 2003).

Diferente da histopatologia convencional, a qual fornece informações morfológicas do tecido avaliado e cujo o diagnóstico pode levar alguns dias para que seja concluído, estas técnicas ópticas evidenciam alterações bioquímicas e estruturais, fornecendo informações que podem ser utilizados para obtenção de diagnóstico precoce e diferencial de várias lesões como a quielite actínica podendo ser obtidas em tempo real (Penteado et al., 2008; Kurachi et al., 2008).

Técnicas baseadas em luz, incluindo quimiluminescência e imagem autofluorescente, trabalham com a suposição de que os tecidos neoplásicos expostas a comprimentos de onda luz, na última década, a tecnologia baseada em luz tem sido adaptada e comercializada para utilização na cavidade oral (Nagi et al, 2016).

Os métodos ópticos como a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia Raman, espectroscopia de infravermelho foram exploradas para sondar e compreender as alterações que ocorrem a nível molecular, durante a transformação de células normais em neoplasma (Elumalai et al, 2015).

A patogênese e o desenvolvimento do câncer são processos multifatoriais controlados por vários genes. A cooperação dos oncogêneses e dos anti-oncogenes na inativação do processo neoplásico causa mudanças significativas nos conteúdos estruturais de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios intracelulares. As mudanças supracitadas podem ser analisadas pela espectroscopia FT-IR possibilitando o diagnóstico de células neoplásicas em nível molecular (Carvalho *et al*, 2012).

As técnicas de biópsia óptica evidenciam alterações bioquímicas e estruturais, fornecendo dados que podem ser utilizados para obtenção de diagnóstico precoce e diferencial de várias lesões, podendo estas informações serem obtidas em tempo real. A histopatológica fornece informações morfológicas do tecido avaliado, entretanto o diagnóstico pode levar alguns dias para que seja concluído. Nos

estudos de tecidos biológicos que apresentavam alterações malignas, a simples observação visual dos espectros obtidos foi suficiente para diferenciar as amostras. Os tecidos com neoplasia maligna demonstram espectros mais irregulares e com mais “ruídos” do que os de tecido normal. Desse modo, uma observação mais apurada dos espectros permitirá identificar grandes diferenças espectrais em algumas regiões, as quais correspondem aos modos vibracionais alterados devido ao processo patológico (Carvalho et al, 2011).

As técnicas ópticas têm sido estudadas extensivamente como uma proposta para o diagnóstico de câncer, porque ao invés de usar uma abordagem baseada em mudanças morfológicas, como atualmente ocorre em estudos histopatológicos, a análise é automatizada e conta com a detecção de alterações bioquímicas que ocorrem nos tecidos tumorais (Bunaciu et al, 2015).

A região espectral denominada de fingerprint ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) mostrou-se promissora para fins de biópsia óptica. Entretanto, as limitações para discriminação de processos displásicos e inflamatórios baseados na região de fingerprint foram encontradas. A região de alto número de onda ($2800\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) fornece informações mais específicas baseadas nas vibrações moleculares e podem ser utilizadas para identificar as alterações sutis que podem ser importantes para diferenciação das amostras (Carvalho *et al*, 2017).

A espectroscopia, nos últimos anos, tem sido considerada como uma ferramenta para triagem de células, tecidos e fluidos biológicos. É uma técnica analítica altamente reprodutível que estuda a estrutura e a conformação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios (Elmi *et al*, 2017).

A espectroscopia de transformada de Fourier (FT-IR) fornece informações multidimensionais sobre os componentes de um tecido, e pode ser usada como uma ferramenta para a caracterização não-invasiva e a identificação das características moleculares de vários tipos de câncer. A espectroscopia FT-IR hoje é um método rápido e fácil de usar. Espectros de infravermelho de excelente qualidade podem ser obtidos a partir de tecidos de câncer de pele imediatamente após a cirurgia de ressecção, sem qualquer preparação das amostras. Esta é uma grande vantagem da espectroscopia total atenuada (FT-IR ATR) para a avaliação histopatológica dos tecidos (Kyriakidou et al, 2017).

Os resultados da espectroscopia FT-IR são capazes de mostrar as mudanças estruturais das células a nível molecular em vários cancros humanos. A

carcinogênese causa mudanças estruturais nos tecidos, a composição química e estrutural das células, tecidos e composição de biofluidos de entidades biológicas estão sujeitas a variações no nível molecular. A espectroscopia não só diferencia células e tecidos com base em suas propriedades espectrais, e composição química e estrutural, mas também tem o potencial de servir como uma ferramenta de diagnóstico para detectar e discriminar diferentes doenças ou progressão da doença devido às alterações induzidas de composição química e estrutural (Bunaciu et al, 2017).

3 PROPOSIÇÃO

Neste projeto propomos a utilização da espectroscopia FT-IR para avaliação da saliva em pacientes fumantes, não fumantes. Nesse sentido, buscamos encontrar biomarcadores de estruturas bioquímicas e moleculares encontrados na saliva, e com isto, proporcionar um diagnóstico precoce para uma lesão *in situ* tornando o tratamento e o prognóstico deste paciente melhor e menos custoso para a saúde pública. Propusemos metodologias e novos equipamentos experimentais para o desenvolvimento da técnica de Espectroscopia FT-IR *in vivo* como procedimento de diagnóstico rápido e não invasivo. Auxiliando sobremaneira os profissionais de saúde tanto no âmbito hospitalar quanto ambulatorial, e dependendo dos resultados encontrados, médicos e cirurgiões-dentistas poderão utilizar a tecnologia em consultório particular.

4 METODOLOGIA

Foram avaliadas 13 amostras de saliva de pacientes: fumantes (F) e não fumantes (C) pela técnica de espectroscopia vibracional FT-IR. Em seguida os dados obtidos pela técnica foram analisados e comparados com os já presentes na literatura, com o objetivo de comprovar a eficácia da técnica diante do diagnóstico dos diversos tipos de lesões bucais, e possivelmente estabelecer o diagnóstico espectral da saliva no câncer bucal.

Com os dados que foram obtidos, poderemos conscientizar os pacientes em tempo real do risco de determinada lesão sofrer uma transformação maligna, ou se a mesma tem características inflamatórias ou se estamos diante de um câncer em estágio inicial. Dependendo do diagnóstico espectral o profissional poderá intervir de maneira rápida no paciente, e em curto prazo levar o mesmo a cura total da doença.

Para os propósitos do presente trabalho foi importante comparar a sensibilidade e especificidade da técnica de biópsia óptica FT-IR e métodos histopatológicos convencionais para se obter um padrão ouro para análise de biomarcadores em saliva.

4.1 Amostragem

Antes do início dos experimentos, este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa pela Universidade de Taubaté através da Plataforma Brasil que teve como aprovação o número 19436919.7.0000.5501 e também usamos amostras da Universidade Federal do Espírito Santo com o número 62653116.0.0000.5060 do Comitê de Ética em Pesquisa da Plataforma Brasil. O número total de pacientes estudados foram de 13, subdivididos em pacientes não fumantes, pacientes fumantes que fumam mais de um maço de cigarro por dia e tem mais de 40 anos. As amostras de saliva dos pacientes foram coletadas na clínica do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo e na Clínica da Universidade de Taubaté.

4.2 Critérios de inclusão e não inclusão

Os pacientes colaboradores deste estudo foram orientados a higienizar a cavidade bucal com água filtrada, própria para consumo, antes da coleta da saliva. Todos os pacientes acima de 18 anos foram incluídos na pesquisa, sem qualquer distinção de sexo. Os pacientes que se encaixaram nos critérios de inclusão e não

inclusão desta pesquisa, antes de qualquer procedimento foram esclarecidos e orientados por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que se encontra em anexo, sobre todo o procedimento a ser realizado.

Foram usados apenas 5 espectros dos pacientes controle e 5 dos pacientes fumantes pois tivemos que excluir 2 amostras do grupo controle e 1 do grupo de fumantes, devido a uma discrepância com o restante das amostragens, tornando estes espectros um erro de amostragem.

4.3 Coleta

Amostras de saliva total não estimuladas foram coletadas por um único pesquisador através do método do cuspe/expectoração. Os participantes foram instruídos a enxaguar a boca com água por 1 minuto e, permanecer durante um minutos sem deglutir e, ao final, cuspir toda a saliva acumulada (cerca de 5 ml) em um tubo estéril milimétrico para a coleta. As amostras foram posteriormente armazenadas em um tubo de coleta (Figura 1) dentro de uma caixa de isopor (Figura 2) e refrigeradas a 4°C por no máximo 72h, sem centrifugação, para serem analisadas por espectroscopia vibracional por meio da técnica de FT-IR ATR.



Figura 1- Tubo de Coleta das Amostras



Figura 2- (Armazenamento)

4.4

Espectroscopia FT-IR

O espectrômetro utilizado foi o Espectrômetro Agilent ATR-FTIR (Figura 3) equipado com cristal de diamante para aquisição dos dados espectrais. No equipamento de FT-IR, as amostras foram inseridas sob o cristal com o auxílio de uma pipeta de volume 1µl, sem aditivos sob o cristal de ATR para obtenção dos espectros. Após a amostra ser alocada no cristal, esperou-se por sua desidratação, sendo realizada em um tempo médio de 1 minuto e meio, para obtenção de melhores espectros. A análise foi realizada com 32 scans de varredura para obtenção da média dos espectros com resolução de 4cm⁻¹.



Figura 3- Espectrômetro Agilent ATR-FTIR

Após cada análise a amostra era removida do cristal com o auxílio de papel absorvente com água Mili Q e limpo com álcool 70% para retirada total da amostra do cristal, evitando assim contaminação entre amostras. Foram realizados 32 scans de background do equipamento a cada amostra analisada para retirar as possíveis interferências.

4.5 Análise de dados

4.5.1 Análise dos espectros

Para efetiva análise dos espectros com a finalidade de se promover o diagnóstico das amostras estudadas por meio das características bioquímicas evidenciadas neste estudo, os espectros foram processados e analisados nas duas etapas seguintes.

4.5.2 Pré-processamento dos dados espectrais

Nesta etapa, os espectros (Figura 4), precisaram se tornar adequados para poderem ser comparados na etapa de análise propriamente dita. Existem alguns artefatos que foram incluídos nos espectros durante sua aquisição, e que nesta etapa poderiam ser minimizados sem prejuízo ao sinal coletado. A metodologia comumente utilizada para remoção da fluorescência é a Correção de Linha de Base.

Poderiam ocorrer ainda pequenas diferenças de intensidade entre os espectros como resultado de fatores experimentais, tais como mínimas variações na intensidade decorrente do tipo de superfície das amostras. Desta forma, há a necessidade de se padronizar os espectros a serem analisados, para que as diferenças que fossem evidenciadas fossem somente referentes às alterações bioquímicas. A ferramenta matemática utilizada para essa finalidade é a normalização por um modo vibracional ou normalização vetorial.

Neste contexto, para a realização dos procedimentos de correção de linha de base, normalização, suavização e estudo da segunda derivada dos espectros, foi utilizado o software MatLab 2018R.

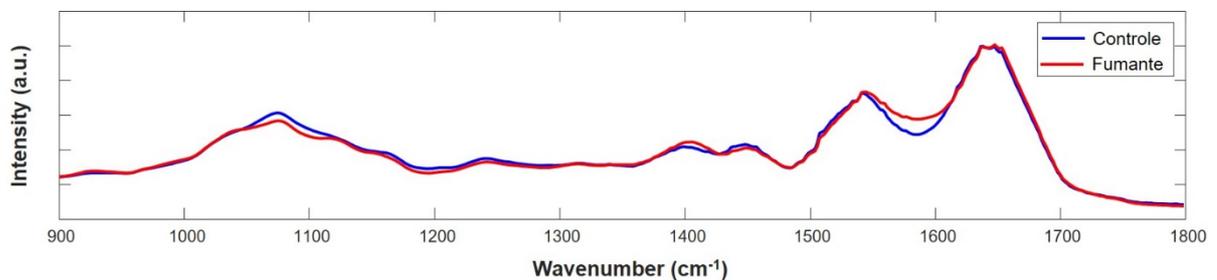


Figura 4 – Gráfico dos Espectros obtidos

4.5.3 Classificação dos espectros – Análises estatísticas

Para esta etapa, a Análise dos Componentes Principais (PCA), rotinas do software MatLab 2018R foram aplicadas ao conjunto de espectros. Esta técnica estatística multivariada não supervisionada é conhecida por ser ferramenta poderosa de análise de dados com muitas variáveis que contêm grande população de padrões individuais. O PCA tem provado ser uma ferramenta valiosa para a redução efetiva de dados através da descoberta de padrões espectrais que revelam as principais características do conjunto analisado. Além do cálculo dos PCs, foram também armazenados os *scores* que possibilitaram a construção do gráfico *Loading Plot* que representa os PCs em relação ao deslocamento do número de onda (Wavenumber), viabilizando a observação dos modos vibracionais destacados.

5 RESULTADOS

Nos resultados preliminares foram usados apenas 5 espectros dos pacientes controle e 5 dos pacientes fumantes pois tivemos que excluir 2 amostras do grupo controle e 1 do grupo de fumantes, devido a uma discrepância com o restante das amostragens, tornando estes espectros um erro de amostragem, encontramos diferenciação em quatro bandas de Fingerprint (Impressão digital dos Espectros). Observamos então os gráficos (Figura 5) a seguir onde encontramos o desvio padrão e os espectro médios das amostras dos dois grupos C e F. As bandas onde localizamos foram a de 1610 cm^{-1} e 1634 cm^{-1} no grupo de pacientes fumantes e 1590 cm^{-1} e 1623 cm^{-1} no grupo de pacientes controle, como demonstrado na figura 6 e na Figura 7 e 8, tendo em vista que no alto número de onda não observamos diferenciações.

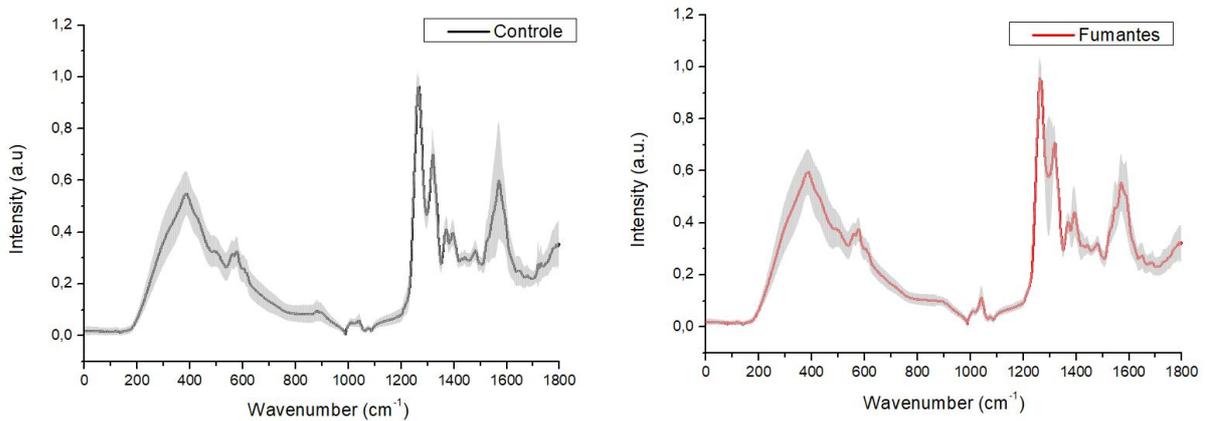


Figura 5 – Espectro médio + desvio padrão

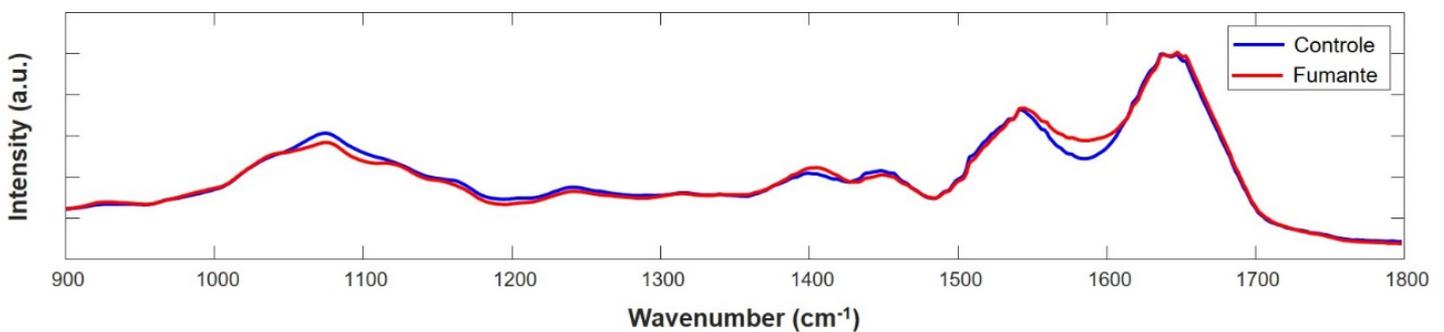


Figura 6 – Gráfico dos Espectros obtidos

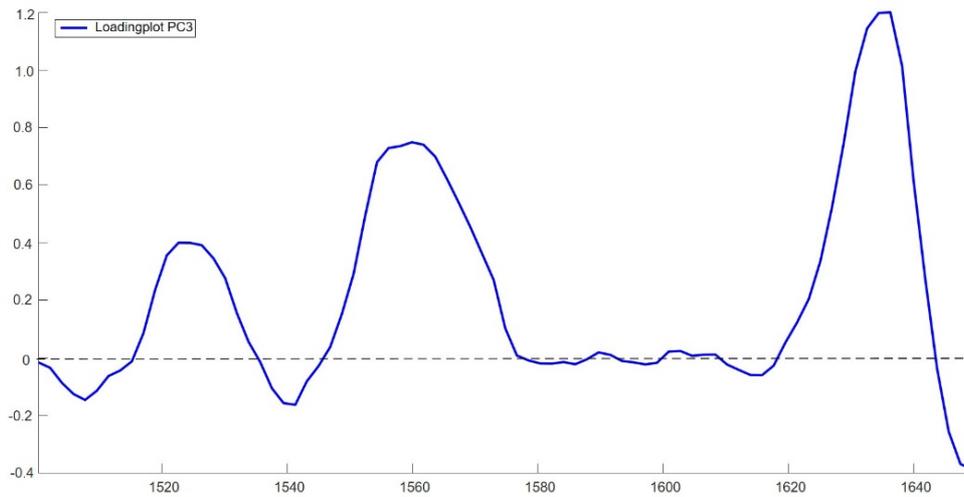


Figura 7 – Loadingplot PC3

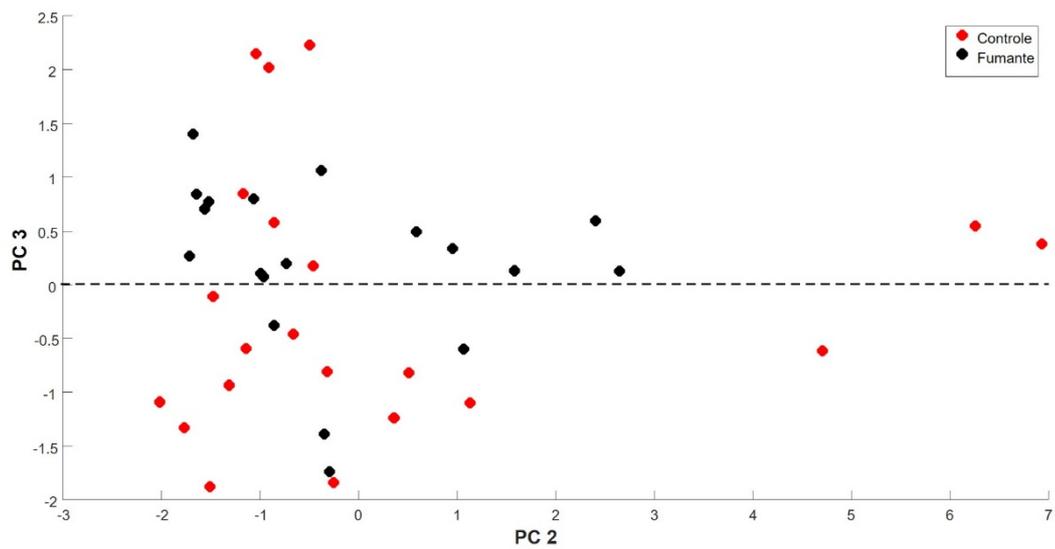


Figura 8 – Scattering plot PC2 x PC3

De acordo com o trabalho do Movasaghi, et al (2008), as bandas citadas acima são de Adenina (DNA) e Uracila (RNA) no grupo dos pacientes Fumantes, já no grupo Controle observamos as bandas de Alongamento de anel de C-C de fenil e Ácidos nucléicos (Figura 9).

<i>Banda</i>	<i>Vibração Molecular</i>	<i>Componentes</i>
1609	1610	Adenina DNA
1632/1634 ou 1635	1634	Uracila RNA ou Amida I
1589	1590	Alongamento do anel C-C de fenil
1620	1623	Ácido Nucleico com Base carbonil

Figura 9 – Tabela com as bandas descritas pelo Movasagui

Para identificar com uma maior precisão as características espectrais contribuintes, foi realizada a segunda derivada do espectro médio da região de Fingerprint (Figura 10), observou-se então diferenciações importantes entre a saliva analisada do grupo C e do grupo F como demonstrado no gráfico.

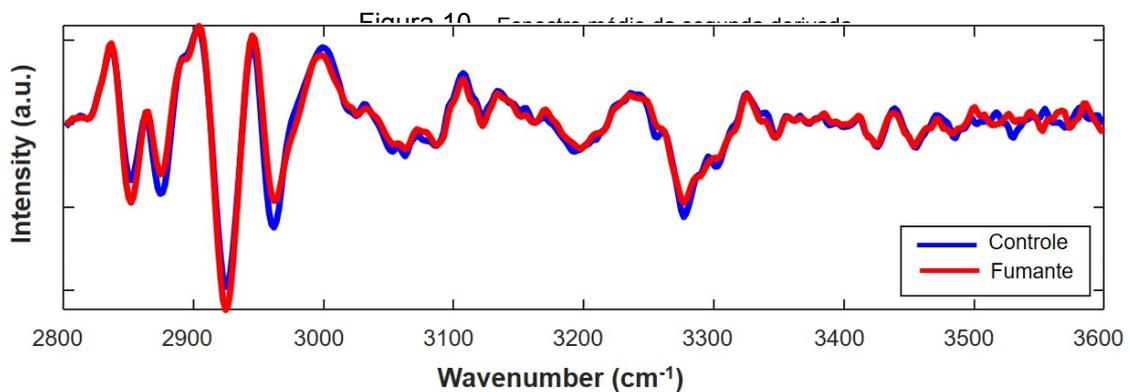
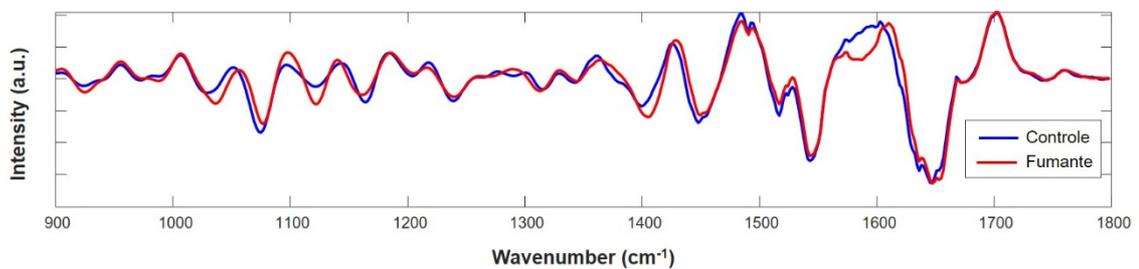


Figura 11– Espectro médio da segunda derivada alto número de ondas

Foi obtido também a segunda derivada do espectro médio da região de alto

número de ondas (Figura 11), porém não foi observado nenhum tipo de diferenciação entre os dois grupos citados. No alto número de ondas da região espectral encontramos bases bioquímicas como: enzimas e proteínas (Movasagui, *et al* 2008), então temos como resultado que não houve modificação entre estas bases bioquímicas das amostras, para biomarcadores.

Na literatura atualmente há poucos estudos citando as bases nitrogenadas de DNA como um tipo de biomarcadores para a saliva de pacientes fumantes, por este motivo este estudo ainda tem muito o que ser sedimentando e se especificar para termos base científica e comprovar os resultados expostos, por este motivo foi possível dizer que são resultados preliminares, pois será necessário aumentar o número de amostras.

Porém com uma busca na literatura encontramos um artigo na literatura que estudou bezerros induzidos a serem etilistas e fumantes e comparou a adução entre o DNA adenina e outras bases para um possível marcador e obtivemos os seguintes resultados: atualmente, a fumaça de cigarro à qual os humanos estão expostos é indeterminada, porém a taxa de remoção espontânea e a eficiência do reparo desses agentes no sangue humano também são desconhecidos. A vantagem de comparar níveis de diferentes agentes no mesmo DNA para elucidar a preferência em locais de adução de DNA é claramente muito importante (Chen *et al*, 2012), pois podemos chegar a discussão que esta adução se diz em metilação do DNA exposto e de preferência da fumaça para sua modificação, podendo ser então uma diferenciação que pode ocasionar a mudança de células basais.

6 DISCUSSÃO

Atualmente não há descrito na literatura biomarcadores para saliva de fumantes que possa diferenciar componentes que podem estar ligados ao câncer bucal, porém neste estudo foi observado através da técnica de espectroscopia FT-IR quatro diferenciações dos grupos controle e fumante, trazendo um novo parâmetro para um possível biomarcador na saliva de pacientes fumantes.

Dados do relatório da World Cancer Report 2008 revelaram que os testes com biomarcador sérico (antígeno prostático específico) apresentaram sensibilidade (Se) de 90% e especificidade (Sp) de 25%. O mesmo recurso indicou que a Se e Sp para o teste de Papanicolau, que detecta o câncer cervical intra-epitelial varia de 47-

62 e 60-95%, respectivamente. A citologia bucal é um dos métodos convencionais mais precisos com uma sensibilidade de 92% e especificidade de 94%.

Tendo em vista que nos resultados encontrado com a técnica de espectroscopia FT-IR analisando a saliva de paciente fumantes chegamos a sensibilidade de 66% e a especificidade de 88%, se comparado ao discutido acima obtivemos um expressivo resultado para um estudo preliminar onde o padrão ouro tem a sensibilidade de 92% e especificidade de 94% no exame citológico.

Publicações recentes envolvendo a espectroscopia FT-IR in vivo tem sido conduzida com alguns resultados promissores abrangendo diversas áreas anatômicas, como para o diagnóstico do câncer cervical (Duraipandian et al., 2013), câncer de pele (Lui et al., 2012) e também para o diagnóstico em processos displásicos no Esôfago de Barret (Bergholt et al., 2013).

A espectroscopia vibracional é uma nova ferramenta de pesquisa sendo atualmente considerada um campo na área biomédica para diagnóstico precoce. Na medida em que as células e os tecidos são estudados por meio de técnicas de espectroscopia vibracional, os biofluidos começaram a ser estudados (Carvalho, 2015, Baker et al., 2016), pois possuem bandas características que refletem sua composição biomolecular, sendo atualmente esta análise denominada de "biópsia líquida" (Bonnieret al,2017).

No atual momento tecnológico é imprescindível que busquemos tais técnicas inovadoras, que de maneira não invasiva e em tempo real, possam fornecer um diagnóstico e informações sobre as características em nível molecular de várias patologias, as quais não podem ser acessadas pelos métodos convencionais, como a análise histopatológica.

Os métodos de diagnóstico disponíveis têm suas limitações quanto rapidez e eficiência na população em geral, o que é de extrema importância nos países em desenvolvimento. Estas limitações são devido ao fato de que todos os métodos são baseados em interpretações subjetivas de anormalidades morfológicas.

Após a continuação deste estudo no ano de 2020 terá um aumento gradativo de pacientes para a sedimentação desta técnica, poderá então ser estendida a clínica para detecção de outros tipos de canceres e processos patológicos sedimentando entre os profissionais de saúde (cirurgiões-dentistas, médicos, fisioterapeutas e enfermeiros) a espectroscopia FT-IR ATR como nova, rápida e confiável ferramenta diagnóstica.

7 CONCLUSÃO

Este estudo preliminar permitiu concluir que: Os espectros obtidos por FTIR ATR foram caracterizados e realizado a identificação bioquímica dos componentes do grupo controle e do grupo de fumantes. Concluímos também que obtivemos bandas de diferenciação entre a saliva do grupo controle e do grupo fumantes, podendo se estender para outro trabalho onde salientaremos a técnica e poderemos observar grupo com câncer bucal e verificarmos se a existência das bandas com relacionadas com este estudo, comprovando um possível biomarcador precoce para o diagnóstico de câncer bucal, melhorando assim o prognostico para este paciente e facilitando através da técnica de FT-IR.

REFERÊNCIAS

Austwick MR, Clark B, Mosse CA, Johnson K, Chicken DW, Somasundaram SK et al. G Scanning elastic scattering spectroscopy detects metastatic breast cancer in sentinel lymph nodes. *J Biomed Opt.* 15:047001, 2010.

Backhaus J, Mueller R, Formanski N, Szlama N, Meerpohl HG, Eidt M et al. Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples. *Vib Spectrosc.* 52:173–177, 2010.

Bergholt MS, Zheng W, Huang Z. Development of a multiplexing fingerprint and high wavenumber Raman spectroscopy technique for real-time in vivo tissue Raman measurements at endoscopy. *J Biomed Opt.* 2013 Mar;18(3).

Bewick V, Cheek L, Ball J *Statistics review 14: logistic regression.* *Crit Care* 9:112–118, 2005.

Brener S , Jeunon F.A , Barbosa A.A , Grandinetti E.M.G, et al. Oral squamous cell carcinoma: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment; *Revista Brasileira de Cancerologia*; 53(1): 63-69, 2007.

Bulgareli V.J, Diniz F.C.C.O, Faria T, E, Vazquez L.F, Cortellazzi L.K, Pereira C.A, et al. Prevenção e detecção do câncer bucal: planejamento participativo como estratégia para ampliação da cobertura populacional em idosos; *Rev. Ciência&Saúde Coletiva*, 18(12):3461-3473,2013.

Bunaciu AA; Hoang VD & Aboul-Enein, H. Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(2), 156–165, 2015.

Cartaxo SB, Santos ID, Bitar R, Oliveira AF, Ferreira LM, Martinho HS, Martin AA. FT-Raman spectroscopy for the differentiation between cutaneous melanoma and pigmented nevus. *Acta Cir Bras* Aug;25(4):351-6, 2010.

Carvalho LFCS et al. Raman spectroscopic analysis of oral cells in the high wavenumber region. *Experimental and Molecular Pathology* 103 255–262, (2017).

Carvalho LFCS, Bitar RA, Arisawa EAL, Brandão AAH, Honório KM, Cabral LAG et al. Spectral region optimization for Raman-based optical biopsy of inflammatory lesions. *Photomed Las Surg.* 28(1):111-7, 2010.

Carvalho LFCS. Análise de processos inflamatórios por espectroscopia vibracional em altos números de onda. Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutor em nanociências e materiais avançados. Faculdade ABC. Santo André, 2012.

Carvalho LFCS. Análise de queilite actínica por espectroscopia micro FT-IR. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título

de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Biopatologia bucal, Área Patologia. São José dos Campos, 2011.

Costa G.E, Migliorati A.C, et al. Oral Cancer; How long does it take from detection of a lesion to the beginning of treatment; Revista Brasileira de Cancerologia, 47(3): 283-89, 2001.

Duraipandian S, Zheng W, Ng J, Low JJ, Ilancheran A, Huang Z. Elmi F et al. Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. Dec 5:187;87-91, 2017.

Elumalai B et al. J. Raman Spectrosc., 46, 84 – 93, 2015.

García-Flores AF, Tenne DA, Choi YJ, Ren WJ, Xi XX, Cheong SW. Griebe M, Daffertshofer M, Stroick M, Syren M, Ahmad-Nejad P, Neumaier M, Backhaus J, Hennerici MG, Fatar M. Infrared spectroscopy: a new diagnostic tool in Alzheimer disease. Neurosci Lett. Jun 8;420(1):29-33, 2007.

Kurachi C; Fontana CR; Rosa LE; Bagnato VS. Fluorescence spectroscopy for the detection of tongue carcinoma--validation in an animal model. J Biomed Opt. May-Jun;13(3), 2008.

Kyriakidou M. FT-IR Spectroscopy Study in Early Diagnosis of Skin Cancer. FT-IR Spectroscopy Study in Early diagnosis of skin Cancer. In vivo31: 1131-1137 ,2017.

Leite G.C.I, Koifman S; et al A review of risk factors for oral and pharyngeal cancer; Revista Brasileira de Cancerologia - Volume 44 n°4 Out/Nov/Dez 1998.

Lieber CA; Nethercott HE; Kabeer MH. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. Biomed Opt Express Sep 20;1(3):975-982,2010.

Lima P.D, Correia C.S.A, Anjos L.A, Boer P.N; et al Use of Saliva for Diagnosis of Oral and Systemic Diseases; Revista Odontológica de Araçatuba, v.35, n.1, p. 55-59, Janeiro/Junho, 2014.

Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res.* May 15;72(10):2491-500, 2012

Melo L.C, Silva M.C, Bernardo P.M.J, Marques B.E, Leite G.C.I; et al Epidemiological profile of incident cases of oral and pharyngeal cancer ; *RGO - Rev Gaúcha Odontol.*, Porto Alegre, v. 58, n. 3, p. 351-355, jul./set. 2010.

Moreno M, Raniero L, Arisawa EAL, Espírito Santo AM, Santos EAP, Bitar RA, Martin A A. Raman spectroscopy study of breast disease. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 125, p. 329-334, 2010.

Moura B.A.S, Medeiros C.M.A, Costa H.R.F, Moraes H.P, Filho Oliveira A.S; et al Diagnostic Value of Saliva in Oral and Systemic Diseases: A Literature Review; *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, v.7, n.2, p.187-194, maio/ago.2007.

Muro CK et al. Sex determination based on Raman spectroscopy of saliva traces for forensic purposes. *Anal. Chem.*, Just Accepted Manuscript. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03988. Publication Date (Web): 24 Nov 2016 Downloaded from <http://pubs.acs.org> on November 25, 2016

Nagi R, Kantharaj Y.B.R, Rakesh N, Reddy J.S, Sahu S; et al Efficacy of light based detection systems for early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: Systematic review; *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* Jul 1;21 (4):e447-55, 2016.

Nanda V; Liang SM; Brand L. Hydrophobic clustering in acid-denatured IL-2 and fluorescence of a Trp NH-pi H-bond. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 29;279(3):770-8, 2000.

Naumann D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Appl Spectrosc Rev.* 36(2:3):239-98, 2001.

Near-infrared-excited confocal Raman spectroscopy advances in vivo diagnosis of cervical precancer. *J Biomed Opt.* Jun;18(6), 2013.

Peisker A, Raschke GF, Fahmy MD, Guentsch A, Roshanghias K, Hennings J, Schultze-Mosgau S. Salivary MMP-9 in the detection of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. May 1;22 (3):e270-5, 2017.

Penteado SC; Fogazza BP; Carvalho CdaS; Arisawa EA; Martins MA; Martin AA; Martinho HdaS. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier transform-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, Jan-Feb 13 (1), 2008.

Petibois C, Deléris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Tren Biotechnol.* ;24(10):455-62, 2006;.

Pinheiro C.E; et al Curso de Bioquímica da Cárie Dental I – Bioquímica da Saliva; *Revista Paulista de Odontologia* 40-47; 2000.

Piva MR, DE Souza LB, Martins-Filho PR, Soares RC, DE Santana Santos T, DE Souza Andrade ES. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part I):Histological grading of malignancy using a binary system. *Oncol Lett*. Nov;2(6):1225-1231, 2011.

Prasad P. *Introduction to Biophotonics*, John Wiley & Sons, 2003.

Reniero F, Guillou C, Calabi L, Paleari L, Biondi L, De Miranda M, Ghelli S.Determination of dissociation constants of (4RS)-[4-carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl)-1-phenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oic acid] in water and biological fluids by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy and the DISCO software package. *Anal Biochem*. Aug 15;319(2):195-205, 2003.

Temperature-dependent Raman scattering of multiferroic $\text{Pb}(\text{Fe}(1/2)\text{Nb}(1/2))\text{O}_3$. *J Phys Condens Matter*. 2011 Jan 12;23(1)

Volkweisl R.V, Blois C.M, Zanin R, Zamboni R; Epidemiologic Profile of the Patients with Oral Cancer in a CEO; *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.*, Camaragibe v.14, n.2, p. 63-70 , abr./jun. 2014.

Werner B; et al. Skin biopsy and its histopathologic analysis. Why? What for? How? Part I; An Bras Dermatol. 84(4):391-5, 2009.

Yakob M. Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma – current state and recent advances. Curr Oral Health Rep. June 1; 1(2): 133–141, 2014.

Chen C.H*, Liu Y. , Simultaneous quantitative analysis of N3-ethyladenine and N7-ethylguanine in human leukocyte deoxyribonucleic acid by stable isotope dilution capillary liquid chromatography–nanospray ionization tandem mass spectrometry.; Journal of Chromatography A. 0021-9673/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.033>

Bonnier, F. et al. Ultra-filtration of human serum for improved quantitative analysis of low molecular weight biomarkers using ATR-IR spectroscopy†. Analyst, v. 142, p. 1285-1298, 2017.

Baker, M. J. et al., Developing and Understanding Biofluid Vibrational Spectroscopy: A Critical Review. Chem. Soc. Reviews., v. 45, n. 1, p. 45,2015.

LISTA DE ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Análise da saliva de pacientes fumantes por espectroscopia FT-IR

Pesquisador Responsável: Jaqueline Maria Brandao Rizzato, Nathalia Guimaraes

Equipe executora: Jaqueline Maria Brandao Rizzato, Nathalia Guimaraes Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade de Taubaté

Telefones para contato: (12) 99196-0318 (21) 9947-5216

Nome do voluntário: _____

Idade: _____

R.G. _____

O (A) Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa tendo como título “Análise da saliva de pacientes fumantes por espectroscopia FT-IR”, de responsabilidade do pesquisador Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho.

A pesquisa se justifica para que seja desenvolvida uma forma de diagnóstico rápido e eficaz permitindo que as doenças bucais sejam diagnosticadas em tempo real. A maior importância reside no diagnóstico de biomarcadores na saliva, pois objetivamos avaliar a saliva de pacientes fumantes que possam se predispor a lesões potencialmente malignas. Os procedimentos de coleta dos dados serão realizados no momento da coleta de saliva, liderado pelo cirurgião-dentista Nathalia Guimaraes. O procedimento em questão será realizado através de um coletor de saliva que será colocado na cavidade oral como se fosse uma seringa para coleta do líquido a ser avaliada, obtendo-se assim os dados necessários. Após a análise iremos observar se existem marcadores nesta saliva e quais são estes, o paciente receberá um adequado tratamento pelo próprio cirurgião-dentista responsável.

Após obtenção dos dados, os resultados serão comparados com a análise laboratorial. A aquisição dos dados só será realizada uma vez no paciente não havendo a necessidade de realizar novas coletas. Há um risco mínimo majoritariamente relacionado ao correto procedimento de biossegurança, um exemplo é o uso indispensável de óculos de proteção, que caso não cumprido, poderá gerar algum dano nos olhos do paciente. Outra consequência da aplicação da luz pode ser o aumento da temperatura das estruturas em aproximadamente 1 °C, porém sem nenhuma interferência estrutural. Riscos mínimos existem, pois haverá a presença de um novo aparelho em campo cirúrgico. O desconforto é inerente ao procedimento cirúrgico. No entanto, a presença do mesmo irá gerar segurança na identificação e preservação de estruturas da cavidade bucal auxiliando também no

diagnóstico das doenças da boca. Os riscos acima citados, quando existentes, são minimizados pela correta execução de todos os procedimentos cirúrgicos além da orientação e avaliação do paciente no pós-operatório, procedimentos padrão realizados pelo cirurgião-dentista responsável. Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão, não sendo utilizado para outras finalidades que não sejam relacionadas a pesquisa. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IPeD) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) – São José dos Campos - SP e outra será fornecida a você. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, uma vez que esta pesquisa não acarretará nenhum dano e o procedimento cirúrgico já seria realizado, mesmo sem a pesquisa. A qualquer momento você poderá solicitar novas informações e motivar sua decisão se assim o desejar. Em caso de dúvidas, acessar os responsáveis pela pesquisa Dr. Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho, supervisionado pelo professor Dr. Airton Abrahão Martin no telefone (12) 3947-1166, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, pelo telefone (12) 3947-1111 ou pessoalmente no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), situado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IPeD) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), sito à Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - São José dos Campos, São Paulo.

Eu, _____, RG nº _____ fui informado (a) e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

São José dos Campos, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente

Nome e assinatura do pesquisador
responsável

Testemunha

Testemunha

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.

Jaqueline Maria Brandão Rizzato

Taubaté, Novembro de 2019