ISSN: 2594-6153

Levantamento do Espectro da Saliva Humana através da Espectroscopia Raman

Daniel Lopes Ometto[1], Marcos Tadeu Tavares Pacheco[2], Landulfo Silveira Jr.[2]

[1] Universidade Anhembi Morumbi – UAM, São Paulo-SP, Brasil
[2] Centro de Inovação, Tecnologia e Educação – CITÉ, Parque Tecnológico de São José dos Capôs, São José dos Campos-SP, Brasil
E-mail: omettodaniel@gmail.com

Resumo: A espectroscopia Raman é uma técnica analítica não destrutiva que permite a identificação de moléculas e compostos químicos com base na interação da luz com a amostra. A análise de biofluidos como a saliva é de grande interesse para a medicina diagnóstica, uma vez que podem oferecer um mapa bastante amplo do metaboloma humano. O objetivo do estudo foi identificar os principais o espectro da saliva de indivíduos saudáveis por meio da espectroscopia Raman. Para isso, foram coletadas amostras de saliva de 20 voluntários em três momentos diferentes, com intervalos de sete dias entre cada coleta. Os resultados do estudo indicaram a presença dos principais picos correspondentes à saliva humana saudável, com espectros sugestivos de moléculas conhecidamente presentes neste fluido. Essas moléculas são importantes para o funcionamento do organismo, estando envolvidas em processos como a síntese de proteínas, neurotransmissão e sinalização celular. Portanto, a espectroscopia Raman pode ser uma técnica promissora para a análise de biofluidos complexos como a saliva, permitindo a identificação de moléculas importantes para o diagnóstico de doenças e avaliação da saúde humana.
Palavras-chave: espectroscopia Raman; saliva; metaboloma humano.

Survey of the Spectrum of Human saliva using Raman Spectroscopy

Abstract: Raman spectroscopy is a non-destructive analytical technique that allows the identification of molecules and chemical compounds based on the interaction of light with the sample. The analysis of biofluids such as saliva is of great interest for diagnostic medicine, as they can offer a very broad map of the human metabolome. The objective of the study was to identify the main spectrum of saliva from healthy individuals using Raman spectroscopy. For this, saliva samples were collected from 20 volunteers at three different times, with seven-day intervals between each collection. The results of the study indicated the presence of the main peaks corresponding to healthy human saliva, with spectra suggestive of molecules known to be present in this fluid. These molecules are important for the functioning of the organism, being involved in processes such as protein synthesis, neurotransmission and cell signaling. Therefore, Raman spectroscopy can be a promising technique for the analysis of complex biofluids such as saliva, allowing the identification of important molecules for disease diagnosis and human health assessment.
Keywords: Raman spectroscopy; saliva; human metabolome.

Introdução

A análise por espectroscopia Raman de amostras biológicas se dá através da excitação das amostras na faixa do infravermelho próximo, onde o espalhamento Raman evidencia as vibrações das ligações químicas moleculares presentes no biomaterial, se apresentando com bandas de diferentes níveis de energia. Desta forma, é possível extrair dados sobre a

ISSN: 2594-6153

composição química das amostras, gerando o que se chama de “impressão digital molecular”, permitindo caracterizar diversos componentes bioquímicos [1].

A espectroscopia Raman apresenta-se como uma nova perspectiva na análise dos componentes moleculares de diferentes biofluidos e biotecidos de forma não invasiva. Por não depender de reações e análises químicas e enzimáticas, permite que o procedimento seja feito em tempo real e sem desperdícios, por necessitar apenas de uma amostra mínima para ser realizada. A espectroscopia Raman, utilizada como biópsia óptica, permite avaliação morfológica e bioquímica do material, com uma ampla aplicabilidade nas mais diversas áreas da medicina e saúde, como, investigação e diagnósticos de cânceres de pele, gastrointestinais, mama, pulmão, próstata, laringe, identificar placas de aterosclerose, assim como estudo de células, vírus e bactérias [3-5]. A técnica pode ser muito útil para investigar alterações no metabolismo humano e tem ganhado muito destaque no monitoramento de biofluidos [6].

A saliva é uma mistura das secreções das glândulas salivares, transudações da mucosa oral, fluido gengival, soro e derivados do sangue provenientes das feridas orais, descamação epitelial das células da mucosa, secreções brônquicas e nasais expectoradas, bactérias e produtos bacterianos, vírus e fungos, assim como outros componentes celulares, além de restos de alimentos. Trata-se de um fluido complexo contendo hormônios, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citocinas [7].

Desde o princípio a saliva foi considerada um bom marcador da saúde bucal, porém com os avanços tecnológicos ela passou a ser comparada com os níveis séricos, e considerada como um ótimo marcador da saúde geral de um indivíduo [7,8]. Assim, existe uma necessidade de otimização dos protocolos de análise de amostras de saliva, e a técnica de espectroscopia Raman é uma candidata para esses protocolos de análise. A maioria dos estudos relatados concentraram-se em proteínas individuais sob condições específicas [9].

Objetivos

Este estudo tem o objetivo de contribuir para o banco de informações sobre os componentes da saliva humana por espectroscopia Raman, com enfoque em indivíduos sadios, a fim de favorecer a literatura sobre o tema e investigar os padrões médios destes componentes em uma população.

Materiais e Métodos

ISSN: 2594-6153

Neste estudo 20 voluntários foram convidados a participar onde o critério de inclusão foi de que os indivíduos possuíssem mais de 18 anos, aceitassem se submeter a todas as coletas, os critérios de exclusão foram indivíduos com doenças já conhecidas ou que apresentassem indícios de doenças. Os métodos da pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Anhembi Morumbi (UAM) (CAAE No. 56270322.8.0000.5492), com todos os voluntários assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a respeito dos procedimentos relativos a esta pesquisa. Todos os voluntários eram alunos do curso de quiropraxia promovido pela UAM, São Paulo, SP.

Foram organizadas coletas de saliva em três fases com 7 dias de intervalo entre cada coleta. Todas as coletas foram realizadas entre as 7h30 e 10h00 e não foi solicitado aos voluntários que se apresentassem em jejum.

Para as coletas foi solicitado que os voluntários colocassem em torno de 5 a 10 mL de saliva em tubos Falcon de 50 mL com tampa. Logo após serem coletados, os tubos foram devidamente fechados e imediatamente congelados em refrigerador a –20 ºC, estas amostras foram mantidas congeladas por todo o período de coleta e por 20 dias decorrentes totalizando 35 dias. Após este período todas as amostras foram descongeladas simultaneamente em temperatura ambiente no dia da realização da coleta dos espectros Raman no laboratório da UAM em São Jose dos Campos, SP.

Os espectros foram obtidos por meio de uma sonda Raman conectada a um espectrômetro Raman. O espectrômetro (modelo Dimension P-1, Lambda Solutions, MA, EUA) é composto por um laser de diodo (830 nm) acoplado a uma sonda Raman (modelo Vector Probe, Lambda Solutions). A sonda está conectada a um espectrógrafo, que coleta o espectro Raman na região da impressão digital (400 a 1800 cm^{-1}). A potência do laser foi ajustada para 300 mW e o tempo de acumulação para coletar o sinal Raman foi definido para 30 s. Espectros em triplicata foram obtidos.

Resultados e Discussão

Foram avaliados 20 voluntários em três dias diferentes: amostras dos Grupos I, II e III. Como os resultados foram pareados, três voluntários foram excluídos do estudo devido à falta em uma das coletas. Logo, restaram 17 voluntários, sendo 8 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, com uma média de idade de 32,4 anos, uma moda de idade de 21 anos e uma mediana de idade de 23 anos, caracterizando uma amostra de voluntários equilibrada entre os sexos, porém bastante jovens. Alguns voluntários ultrapassando os 50 anos de ambos os

ISSN: 2594-6153

sexos. Foram consideradas portanto 17 amostras em cada coleta, nos grupos I, II e III, totalizando 51 amostras de saliva utilizadas. As amostras foram submetidas à coleta de espectros Raman, com três coletas de cada amostra, resultando em 153 espectros.

A fim de melhorar a observação dos picos característicos da amostra, foi obtido um espectro da água e este espetro foi subtraído de cada um dos espectros da saliva (espectro das substâncias presentes na saliva sem interferência da água). A Figura 1 apresenta o espectro da saliva com o "background" da água, o espectro da água e o espectro após a subtração. A Figura 2 apresenta o espectro médio da saliva após a subtração do espectro da água.

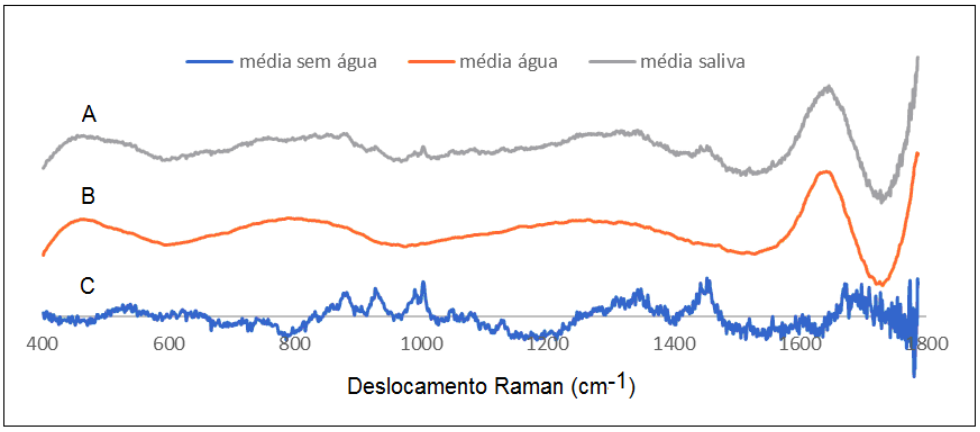


Figura 1. Espectro Raman da saliva (A), espectro Raman da água (B) e espectro Raman da saliva após a subtração do espectro da água (C).

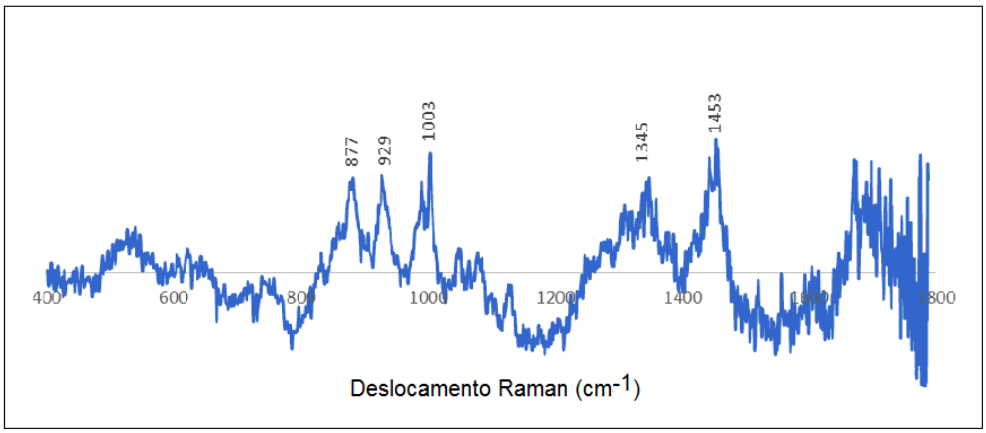


Figura 2. Espectro médio de todas as amostras de saliva com os picos destacados.

O espectro Raman médio da saliva da Figura 2 demonstrou picos em 877 cm^{-1}, que podem ser atribuídos ao anel aromático do triptofano e tirosina [10,11], pico em de 929 cm^{-1}, compatível com pico do aminoácido arginina [6], pico em 1003 cm^{-1}, que pode ser atribuído ao anel aromático da fenilalanina [12], picos em 1313 até 1457 cm^{-1}, que podem ser devido ás

ISSN: 2594-6153

vibrações de estiramento e deformação dos grupos metileno (CH_2) e metil (CH_3) tanto de proteínas celulares e enzimáticas quanto de lipídios [13].

Os componentes bioquímicos descritos acima se somam para criar um descritivo da saliva humana e contribuem para o esforço da caracterização e criação de um banco de dados do metaboloma humano, esforço este que com o aumento do volume de dados compilando as informações criadas por vários pesquisadores ampliam a fronteira do uso da saliva tanto como um biomarcador para a saúde quanto para o estabelecimento da espectroscopia Raman como meio diagnóstico na medicina.

Conclusão

O espectro Raman evidenciado por este estudo se assemelha aos descritos na literatura e sugere a presença de aminoácidos, proteínas e lipídios. Este estudo se propõe a estabelecer padrões espectrais Raman da saliva humana com finalidade de uso dessa informação espectral em diagnóstico médico. A saliva é um biofluido de fácil obtenção e sua caracterização poderá auxiliar na determinação do metaboloma humano com vistas ao diagnóstico de alterações metabólicas locais ou sistêmicas.

Referências

1. Hanlon EB, et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. Phys. Med. Biol. 45: R1-R59 (2000).
2. Bispo JAM, et al. Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the riskof developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. J. Biomed. Opt. 18: 87004 (2013).
3. Rohleder D, Kiefer W, Petrich W. Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy. Analyst 129: 906-911 (2004).
4. Schut TCB, Wolthuis R, Caspers GJ. Real-time tissue characterization on the basis of in vivo Raman spectra. J. Raman Spectrosc. 33: 580-585 (2002).
5. Nunes LD et al. FT-Raman spectroscopy study for skin cancer diagnosis. Spectroscopy Int. J. 17: 597-602 (2003).
6. Virkler K, Lednev IK. Forensic body fluid identification: The Raman spectroscopic signature of saliva. Analyst 135: 512-517 (2010).
7. Malathi M, Mythil SI, Vasanthi HR. Salivary diagnostics: A brief review. ISRN Dent. 2014: 158786 (2014).
8. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. Oral Dis. 8: 69-76 (2002).
9. Calado C, et al. Raman spectroscopic characterization of non stimulated and stimulated human whole saliva. Clin. Spectrosc. 3: 100010 (2021).
10. Koljenović S, et al. Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue. J. Biomed. Opt. 9: 1187-1197 (2004).

ISSN: 2594-6153

11. Talari ACS, et al. Raman spectroscopy of biological tissues. Appl. Spectrosc. Rev. 50: 46-111 (2015).
12. Carlomagno C, et al. COVID-19 salivary Raman fingerprint: innovative approach for the detection of current and past SARS-CoV-2 infections. Sci. Rep. 11: 4943 (2021).
13. Badea J, et al. Characterization of resting versus stimulated saliva fingerprints using middle-Infrared spectroscopy assisted by principal component analysis. Rom. Biotechnol. Lett. 19: 9817-9826 (2014).