Universidade Santo Amaro

Doutorado em Odontologia

Graziele Parize

Avaliação da saliva utilizando o método de ATR/FTIR para auxílio no diagnóstico da periimplantite

São Paulo

2023

Graziele Parize

Avaliação da saliva utilizando o método de ATR/FTIR para auxílio no diagnóstico da periimplantite

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia Unisa de São Paulo, UNISA – Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia com área de concentração em Implantodontia.
Orientadora: Prof. Dra: Debora Pallos

São Paulo

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar aqui, e conseguir concluir mais uma etapa da minha formação, e aos meus pais Miguel e Maria por me incentivarem sempre e estarem ao meu lado em cada uma destas conquistas, e nunca medir esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos.

Ao meu marido Jeanderson por todo apoio nestes anos, e por seguir caminhando ao meu lado e sonhando junto comigo. E seus pais Neiva e Claudinei por todo o seu carinho e amor sempre.

Um agradecimento mais do que especial a minha Orientadora Debora Pallos, pelas correções e por ter desempenhado tal função com dedicação e amizade e por todos os seus ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e também como pessoa, sou muito grata a você por estar ao meu lado em todos esses anos e nunca deixar de me motivar, espero que eu possa levar a sua amizade por longos anos.

Aos professores do programa de Doutorado da UNISA, por todo o seu amor á profissão, transmitindo seus ensinamentos e estimulando nossas ações para nos transformar em Implantodontistas mais qualificados. O meu muito obrigado por cada uma das conversas que me fizeram amadurecer como pessoa e profissional, vocês são os verdadeiros time de ouro do professor Wilson Roberto Sendyk.

Não poderia deixar de agradecer ao coordenador do programa de Doutorado, professor Dr Wilson Roberto Sendyk por mais esta oportunidade e por poder ter o privilégio de conviver com o senhor por mais estes anos. Aprendendo sempre, muito honrada em ter compartilhado destes anos ao seu lado.

Agradeço aos meus colegas de Doutorado, quantas pessoas maravilhosas, e o quanto isso foi importante para que a jornada se tornasse algo mais leve e ainda mais prazerosa.

A Universidade Federal do ABC (UFABC), por disponibilizar a sua infraestrutura para análise do material, juntamente com o professor Dr Herculano Martinho, pela ajuda e dedicação na análise das amostras e pelos ensinamentos na Espectroscopia óptica.

A minha amiga Gabrielle Teodoro Nepomuceno pela sua dedicação e ajuda no desenvolvimento das amostras, análises e todo o seu comprometimento em ajudar no entendimento dos dados e em cada uma das etapas do desenvolvimento da tese, sou muito grata a você, por toda a sua ajuda.

Um agradecimento especial a Universidade Santo Amaro, por sempre me acolher da melhor forma e pela oportunidade, não somente do estudo como também pelo incentivo pela bolsa de estudo que me foi oferecida e da qual eu sou muito grata. A todos os funcionários que fazem a diferença, principalmente a Márcia e os demais colaboradores da biblioteca, por sempre serem muito solícitos.

A Capes, pela bolsa de Doutorado concedida através do programa de Pós Graduação.

RESUMO

A periimplantite é caracterizada como uma alteração patológica dos tecidos ao redor dos implantes osseointegrados. A espectroscopia FTIR fornece informações moleculares por meio de fenômenos ópticos observados pela vibração de suas moléculas, e sendo empregada em estudos biológicos para a caracterização das alterações e como uma forma de diagnóstico. No entanto são escassos os estudos que usem este tipo de análise associada a periimplantite. Objetivou-se avaliar através da espectroscopia FTIR a doença periimplantar e foram analisadas as regiões de *fingerprint* de 800 - 2000 cm $^{-1}$. Então foram avaliadas 40 amostras de saliva, sendo 18 do grupo controle (C) e 22 amostras do grupo periimplantite (P). Avaliou-se os dados clínicos como índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS), e nível de inserção (NI). A análise da saliva foi realizada através do método FTIR/ATR, para aquisição dos espectros relevantes e análise biomolecular de cada um deles. Os resultados dos parâmetros clínicos demonstraram diferença estatística quando comparado os dois grupos; com exceção do índice de placa (IP). Na análise com FTIR/ATR, os componentes principais revelaram nove bandas como sendo as mais significativas. O modelo da classificação PLS-DA com cinco componentes foi observado com uma precisão de 81%. As maiores vibrações observadas pelo gráfico de Box Plot relacionam-se aos modos vibracionais de ácidos graxos, histidina, éster de lipídeos, ácidos nucléicos, triptofano. As maiores alterações vibracionais estão relacionadas a marcadores inflamatórios. Conclui-se que a espectroscopia FTIR provê características moleculares importante das amostras e que os resultados somados aos dados clínicos mostram uma efetividade do uso desta ferramenta no diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Peri-implantite, Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier, Análise Espectral.

ABSTRACT

Peri-implantitis is characterized as a pathological change in the tissues around osseointegrated implants. FTIR spectroscopy provides molecular information through optical phenomena observed by the vibration of its molecules, and is used in biological studies to characterize changes and as a form of diagnosis, however, there are few studies that use this type of analysis associated with peri-implantitis. The objective was to evaluate peri-implant disease using FTIR spectroscopy and the fingerprint regions of 800 - 2000 cm^{-1} were analyzed. Then, 40 saliva samples were evaluated, 18 from the control group (C) and 22 samples from the peri-implantitis group (P). Clinical data such as plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PS), and insertion level (NI) were evaluated. Saliva analysis was performed using the FTIR/ATR method, to acquire the relevant spectra and biomolecular analysis of each of them. The results of the clinical parameters demonstrated a statistical difference when comparing the two groups; in excess of the plaque index (IP). In the FTIR/ATR analysis, the main components revealed nine bands as being the most significant. The largest vibrations observed by the Box Plot graph are related to the vibrational modes of fatty acids, histidine, lipid esters, nucleic acids, tryptophan. The five-component PLS-DA classification model was observed with an accuracy of 81%. It is concluded that FTIR spectroscopy provides important molecular characteristics of the samples and that the results added to clinical data show the effectiveness of using this tool in diagnosing the disease.

.

Keywords: Peri-implantitis, Fourier transform infrared spectroscopy, Spectral Analysis.

SUMÁRIO

RESUMO 5
ABSTRACT 6
SUMÁRIO 7
LISTA DE TABELAS 9
LISTA DE ANEXO 10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 11
1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1 Tecnologias Fotônicas 14
2.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier 16
2.3 Biomarcadores em fluidos corporais 19
2.4 Saliva 21
2.5 Amostra de biofluidos e seus desafios 21
2.6 Periimplantite 27
2.7. Métodos utilizados para análise estatística na espectroscopia 27
2.7.1 Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) 27
*2.7.*2 Análise de Componentes Principais (PCA) 27
2.7.3 Método de Estudo PLS-DA 27
2.7.4 Rstudio 27
3. OBJETIVO 27
4. MATERIAIS E MÉTODOS 27
4.1 Caracterizações dos pacientes 27
4.2 Parâmetros clínicos avaliados 30
4.3 Preparo Das Amostras Para a Análise de FTIR 30
4.4 Análise dos Dados 33
5. RESULTADOS 35
6. DISCUSSÃO 50
7.CONCLUSÃO 57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58
ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa 68
Apêndice 1 69

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo dos modelos vibracionais

Figura 2: Esquema do Funcionamento um Equipamento de FTIR.

Figura 3: Gotas de Fluídos Biológicos

Figura 4: Esquema Exemplificando o Preparo das Amostras

Figura 5: Disquete com as Amostras já Depositadas

Figura 6: Imagem do aparelho FTIR utilizado

Figura 7: Exemplo de como é realizada a análise com o ATR

Figura 8: Acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) para Micro FT-IR.

Figura 9: Representação do Espectro Médio

Figura 10: Representação do Espectro Médio após normalização

Figura 11: Outliers identificados na inspeção do Q residual versus Hotellings T^2.

Figura 12: Gráfico de componentes com as suas porcentagens de acordo com a quantidade de componentes.

Figura 13: Gráfico com os componentes e com a determinação dos fatores avaliados e da superioridade do grupo com cinco componentes.

Figura 14: Gráfico com as informações da acurácia e de R2 e Q2 de acordo com cada grupo.

Figura 15: Vip score pontuação para bandas estatisticamente relevante, discriminado os grupos (C) controle e (P) periimplantite.

Figura 16: Heatmap para Dados Espectrais.

Figura 17: Bandas maior relevância de acordo com o vip score (Curva ROC).

Figura 18: Box plot para candidatos chave de banda vibracional.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Apresentam os Dados Demográficos com os Parâmetros Periimplantares.

Tabela 2: Atribuições de cada Banda significativa.

LISTA DE ANEXO

ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR= Reflexão Atenuada Total

AUC= *Assets Under Custody*

C = Grupo Controle

Ca+ = Cálcio

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

CL- = Cloro

FTIR= Infravermelho por Transformada de Fourier

H2PO4- = Dihidrogenofosfato

HCO3- = Bicarbonato

He-Ne= Hélio-neon

HPO2 = Ácido fosforoso

IR= Infravermelho

K+ = Potássio

Mg2+ = Magnésio

NaCl = Cloreto de sódio

P = Grupo Periimplantite

PCA= Principal Componente Analisado

PCs= Componente Principal

ROC= *Receiver Operator Characteristic Curve*

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFABC = Universidade Federal do ABC

UNISA = Universidade Santo Amaro

1 INTRODUÇÃO

A saliva é composta por água (99%) e uma variedade de íons inorgânicos como, por exemplo, o potássio (K^{++}), cálcio (Ca^{+}), magnésio ($Mg2^{+}$), cloro (CL), bicarbonato ($HCO3^{-}$), dihidrogenofosfato ($H2PO_4^{-}$), ácido fosforoso (HPO_2) e proteínas (imunoglobulinas, muco, ureia, ácido úrico) que formam a porção restante (Katsani e Sakellani, 2019). Tendo como principal função de lubrificar e diluir o alimento (facilitando a mastigação, gustação e a deglutição), além de proteger contra bactérias e umedecer a cavidade bucal (Marsh et al., 2015). Mais de 700 microrganismos também foram encontrados na cavidade bucal que podem estar relacionados à saúde bucal e outras doenças periodontais e sistêmicas (Zhang et al., 2013). Foi sugerido que o microbioma oral humano contribui com mais de 2.000 proteínas microbianas de mais de cinquenta gêneros bacterianos (Lamont et al.,2018, Katsani e Sakellani, 2019). Os biomarcadores salivares têm sido sugeridos como adequados para triagem regular e detecção precoce de muitas condições como alguns tipos de cânceres (ovário, pâncreas, mama e de boca), alguns graus de demência como Alzheimer (Lopes et al., 2016., Sugimoto et al., 2010).

Atualmente a espectroscopia surgiu como uma das principais ferramentas para aplicação biomédica e com grande uso e progresso no campo da avaliação clínica (Movasaghi et al., 2008). A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) funciona através da mensuração da absorção da radiação infravermelha (Naseer et al., 2020). Sendo uma técnica espectroscópica vibracional que pode ser usada para sondar as mudanças moleculares associadas aos tecidos. O método é empregado para encontrar formas mais conservadoras de análise para medir as características dentro do tecido e das células, faz a análise das atribuições dos grupos funcionais, tipos de ligação e conformações moleculares (Movasaghi et al., 2008). Essa técnica é particularmente atraente para análise de biofluidos, uma vez que são fáceis de aplicar, necessitam pouca preparação da amostra e são adaptáveis a vários fluídos corporais. Reduz potencialmente o tempo de análise e alivia a espera pelo resultado (Parachalil et al., 2020).

Essas técnicas espectroscópicas vibracionais são relativamente simples, reproduzíveis, não destrutivas para o tecido e são necessárias pequenas quantidades de material (de microgramas a nanogramas) com uma preparação mínima da amostra que pode ser analisada. As bandas espectrais nos espectros vibracionais são específicas da molécula e fornecem informações diretas sobre sua composição, sendo uma ferramenta para detecção de doenças e seu acompanhamento (Movasaghi et al., 2008).

Nas últimas décadas, a colocação de implantes dentários tornou-se um procedimento de rotina na reabilitação oral. No entanto, o número de pacientes/implante afetado por doenças periimplantares está aumentado. Como não existem conceitos estabelecidos e previsíveis para o tratamento da periimplantite, a prevenção primária é de fundamental importância. O diagnóstico precoce e o manejo da mucosite é considerado uma medida preventiva para o aparecimento da periimplantite (Scarano et al., 2020).

Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi identificar os perfis salivares que apresentam maior alteração e qual a sua importância em relação á doença periimplantar, com a análise da saliva e o uso do FTIR/ATR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecnologias Fotônicas

A prevalência de doenças está aumentando rapidamente devido a fatores que incluem genética, mudanças no estilo de vida, câncer e vários tipos de agentes infecciosos de evolução rápida. Atualmente, muitos tipos de testes presuntivos e confirmatórios estão sendo usados em todo o mundo para identificar indivíduos em risco e diagnosticar doenças específicas usando fluidos corporais (Naseer et al., 2020).

Com os avanços no sentido de buscar técnicas mais eficientes e efetivas no diagnóstico de doenças, a análise espectroscópica de fluido biológico como o sangue, saliva, urina, trazem inúmeras vantagens aos pacientes, acarretando um melhor prognóstico e uma diminuição na mortalidade (Bel´skava e Sarf, 2021).

Na biópsia óptica é utilizada a tecnologia fotônica, onde ocorre uma interação entre a luz e a matéria, sendo esta estabelecida pela teoria eletromagnética de Maxwell, mais conhecida como técnica de espectroscopia. Esta é definida como a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. De maneira direta, são obtidas as diferenças entre estes níveis de energia a partir de medidas que determinam as posições relativas dos níveis energéticos. No caso das moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis energéticos envolvidos: eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais. Assim as vibrações moleculares podem ser medidas por diferentes técnicas como a espectroscopia de Raman e espectroscopia de absorção no Infravermelho, ou através da análise da “nuvem” eletrônica como a espectroscopia de absorção Eletrônica e a espectroscopia de Fluorescência (Naumann, 2001; Kuzmanny et al., 2009).

2.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro no infravermelho médio (4000-400 cm^{-1}) é a região de principal interesse para aplicações biomédicas. Isso compreende a chamada região de impressão digital, exibindo bandas de absorção característica para lipídios, proteínas, amida I/II, carboidratos e ácidos nucléicos (Balan et al., 2019;De Carvalho et al., 2018). Semelhante à espectroscopia Raman, a espectroscopia de infravermelho fornece “impressão digital bioquímica completa” de amostras por meio das características espectrais. A espectroscopia infravermelho (IR) pode ser realizada usando o modo tradicional de “transmissão direta” ou o modo ATR (reflexão total atenuada) sensível à superfície, ou o modo de refletância difusa (ERD) (Provasi et al.,2016).

O desenvolvimento da técnica utiliza um feixe de infravermelho incidente na amostra, ocorrendo assim á absorção em contato com o material, sendo expresso em forma de vibração molecular. Estas vibrações trazem características químicas da amostra. Pode haver vários tipos de vibrações moleculares que irão caracterizar uma infinidade de moléculas, podendo ser caracterizadas como um agrupamento vibracional, deformações vibracionais e torções ou estruturas vibracionais. São apresentados na Figura 1 os modelos vibracionais relatados.

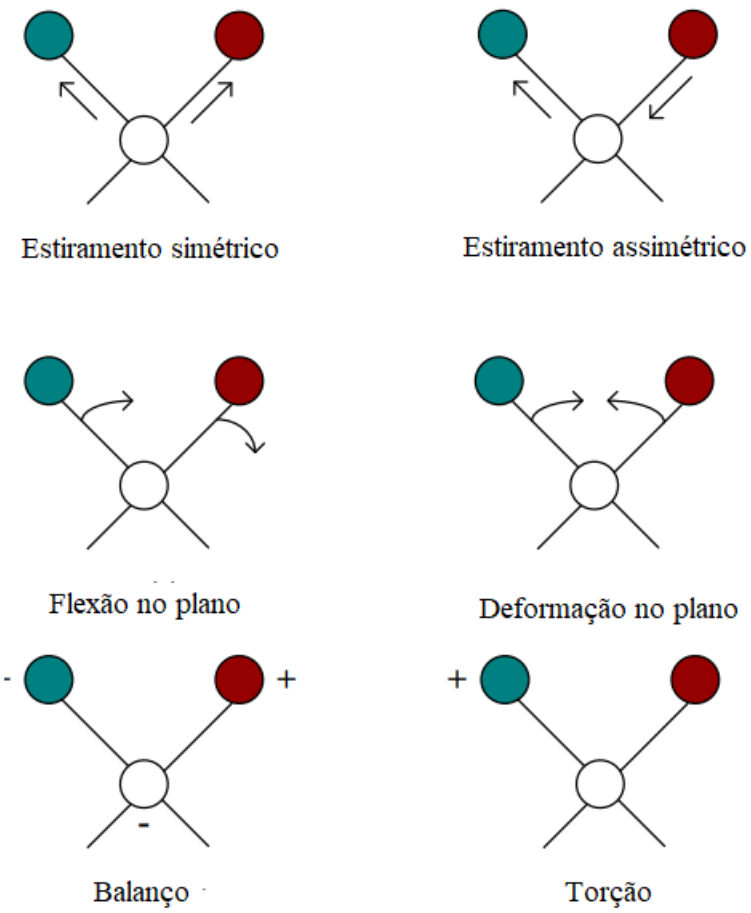


Figura 1: Exemplos dos modelos vibracionais

Fonte: Adaptado de Yu et al.,2009

Há vários tipos de ligações entre os átomos podendo ser simples, duplas ou triplas, o que as difere é quanto a diferença de energia e massa que os átomos estão conectados. As bandas observadas na região espectral apresentam as classes de substâncias presentes na amostra (Kuzmany, 2009). Na figura 2 é possível observar o funcionamento do espectrofotômero por transformada de Fourier.

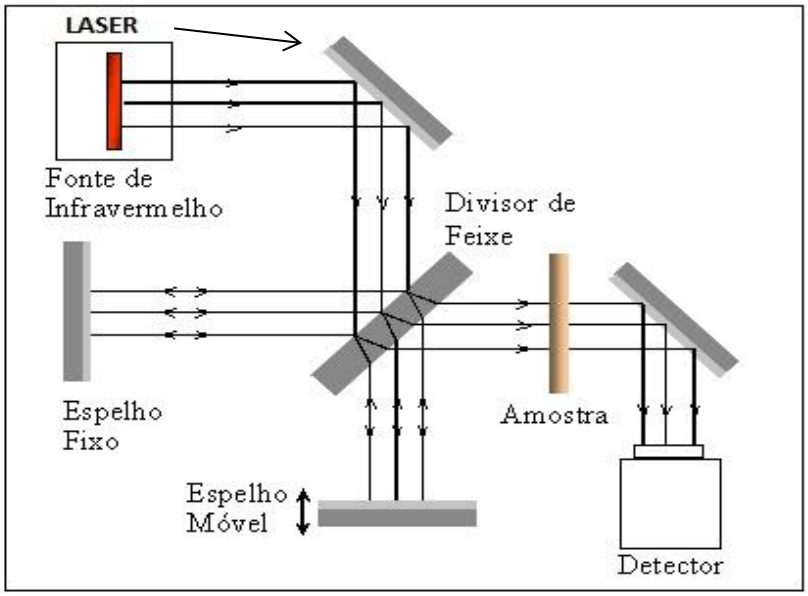


Figura 2: Demonstração do funcionamento do aparelho de FTIR
Fonte: UNESP (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)

O FTIR possui como o principal elemento óptico o interferômetro de Michelson (Kuzmany, 2009), que seriam dois espelhos, sendo eles o fixo e o móvel, além de um divisor de feixe, este transmite a radiação incidente entre os dois espelhos. Os espelhos refletem os feixes para o divisor e se recombinam, tanto de forma construtiva quanto destrutiva, a soma de todas estas interações, tem como resultado o sinal chamado interferograma. Assim é aplicada a transformada de Fourier que é uma operação matemática que converte os dados obtidos no interferômetro em um espectro que relaciona intensidade x número de onda (Pavia et al., 2015). O interesse de se usar a espectroscopia FTIR para diagnóstico é obter informações sobre a estrutura, composição química e molecular da amostra *(*Kumar; Srinivasan; Nikolajeff, 2018).

A estrutura e função molecular estão associadas e possuem papel importante na bioquímica celular como no caso das proteínas. As alterações em proteínas e lipídeos e em outras composições de um tecido ou amostra biológica são marcadores importantes para a comparação de espectros entre amostras de pacientes saudáveis e com algum tipo de patologia, como por exemplo, tecido com presença de células tumorais. Além disto, é uma técnica

facilmente replicável, e com o benefício do baixo custo. Isto tem impulsionado a utilização dessa tecnologia, bem como o seu aprimoramento com novos espectrômetros analíticos de infravermelho, mais rápidos e com alta sensibilidade espectral (Bunaciu; Hoang; Aboul-Enein, 2015).

A espectroscopia de FTIR permite a análise de diversas substâncias orgânicas e inorgânicas de maneira simples, com uma alta precisão, reprodutibilidade e baixo custo, o que vislumbra que esta técnica pode colaborar com a biomedicina e somar de maneira positiva na qualidade de vida dos pacientes. Monitorar e avaliar o estado de saúde de um indivíduo através dos componentes biológicos de sua saliva é algo relevante e promissor na rotina clínica (Nogueira et al., 2022).

Parachalil et al., 2020., Quinn et al., 2016 relataram os espectros ATR-FTIR de cinco fluidos corporais - sangue periférico, saliva, sêmen, urina e suor. O estudo aliado à análise quimiométrica foi capaz de discriminar os tipos de fluidos corporais dos espectros, o que é útil para aplicações forenses. Os espectros de saliva mostraram picos característicos decorrentes de proteínas em 3279 cm^{-1}(Amida A), 1640 cm^{-1}(Amida I), 1537 cm^{-1}(Amida II) e 1239 cm^{-1}(Amida III). O alongamento simétrico e assimétrico C-H e o alongamento carbonil (C=O) dos grupos éster contribuíram para picos em 2943 cm^{-1}, 2854 cm^{-1}, e 1743 cm^{-1}. Além disso, a banda característica do tiocianato foi identificada em 2057 cm^{-1}. Ozek et al., (2016) também usaram espectros ATR-FTIR para a discriminação de fluidos corporais, para aplicações forenses (Alkhuder etal., 2022).

Um trabalho recente explorou esta técnica no diagnóstico de periodontite na saliva (Beyer-Hans et al., 2020). A análise realizada em espectros de ATR pode diferenciar entre controles e pacientes com periodontite agressiva generalizada. Outros estudos foram relatados sobre a diferenciação de periodontite agressiva e crônica usando espectroscopia ATR-FTIR. Esses estudos identificaram características diferenciadoras em 2.800 - 3.000 cm^{-1} , podem ser atribuídas a lipídios e proteínas em pacientes com periodontite (Derruau et al., 2019; Nepomuceno et al., 2023).

2.3 Biomarcadores em fluidos corporais

Os biomarcadores são compostos imunorreativos que contém assinatura química e são encontrados nos fluidos e tecidos corporais como as proteínas contidas na saliva, os mesmos podem indicar função normal ou apresentar algum sinal de alteração como o aparecimento de alguma doença (Liebsch et al., 2019).

O fluido corporal salivar está sendo utilizado como uma via de diagnóstico para doenças sistémicas e crônicas. A caracterização ATR-FTIR da saliva foi considerada útil no diagnóstico da doença renal crônica (DRC). Verificou-se que os marcadores espectrais de tiocianato e fosfolipídios/carboidratos podem ser um valioso painel de biomarcadores para identificar DRC (Rodrigues et al., 2019). Banda Amida II presente em 1545 cm^{-1} nos espectros ATR-FTIR da saliva foi relatada como um marcador característico para pacientes psoriáticos e diabéticos (Liebsch et al., 2019; Nogueira et al., 2022).

2.4 Saliva

A saliva é um fluido biológico presente na cavidade oral; composto por secreções de três glândulas principais (sublingual, parótida e submandibular) e quatro menores (vestibular, palatina, lingual e labial). Em uma pessoa saudável, a secreção salivar diária média fica entre 0,5-1,5 L. Como a coleta de amostra é simples, rápida e não invasiva, não é apenas confortável para o paciente, mas também conveniente para os profissionais de saúde, já que não há risco de auto contágio ou lesão percutânea (Naseer et al., 2020).

O diagnóstico de patologias bucais é realizado por meio da análise histopatológica que é um procedimento invasivo e que tem tempo de resultado longo, diante disto no estudo é possível fazer a utilização da saliva como uma ferramenta de diagnóstico de doenças como câncer bucal e outros tipos de câncer e até doenças sistémicas como Alzheimer (Sugimoto et al., 2010).

As amostras de sangue e urina possuem uma facilidade de obtenção, mas se comparada às amostras em saliva, suas técnicas são um pouco mais invasivas, e se tratando do uso do sangue e da urina, torna –se limitado no uso na prática clínica (Naseer et al., 2020).

Sugimoto et al., 2010 usaram a saliva como biofluido para avaliação de marcadores específicos para doenças como câncer de mama, pâncreas e boca. Foi possível fazer a análise dos metabólicos envolvidos em cada uma das doenças, verificando um aumento significativo do triptofano e das polimanimas em pacientes com câncer bucal. Já Nogueira et al., 2022 utilizaram em seu estudo esta forma de análise de dados associado ao uso de saliva como biofluido para validar o FTIR como ferramenta de diagnóstico de diabetes mellitus e periodontite.

O fluido salivar possui várias vantagens sobre o sangue e outros fluídos corporais. A coleta é não invasiva e indolor, rápida, econômica, e pode ser facilmente transportada e armazenada (Cameron et al., 2016).

E é possível encontrar biomarcadores específicos na saliva para doenças como câncer de mama, vírus da imunodeficiência humana (HIV), diferentes graus de demência (Anderson et al., 2020).

2.5 Amostra de biofluidos e seus desafios

Tanto o preparo, quanto as condições da amostra são de extrema importância para que se obtenham as informações corretas que estão contidas na mesma. Conforme o que foi pesquisado por Cameron et al., (2018) a gelatinização parcial, gradiente de concentração, formação de trincas e as heterogeneidades diversas, podem ser observadas quando o material em questão for o uso de biofluídos.

O processo de secagem, a diluição e as condições ambientais impactam no padrão formado; este é de grande relevância quando se trata das maneiras como o mesmo pode ser aplicado como na indústria, triagens de

medicamentos, bioensaio de impressão de DNA e na área de espectroscopia vibracional, principalmente na utilização de biofluídos corporais para diagnósticos e acompanhamento de doenças.

Pode-se observar no uso de gotas de fluidos biológicos, biofluidos (sangue, saliva, lágrima, etc) um efeito de rachadura quando ocorre a gelatinização da amostra o que está relacionada à centena de componentes diferentes como proteínas, enzimas, lipídeos e eletrólitos, como é representado na imagem abaixo. Na figura 3 é possível observar o perfil de rachadura formando em amostras de biofluidos.

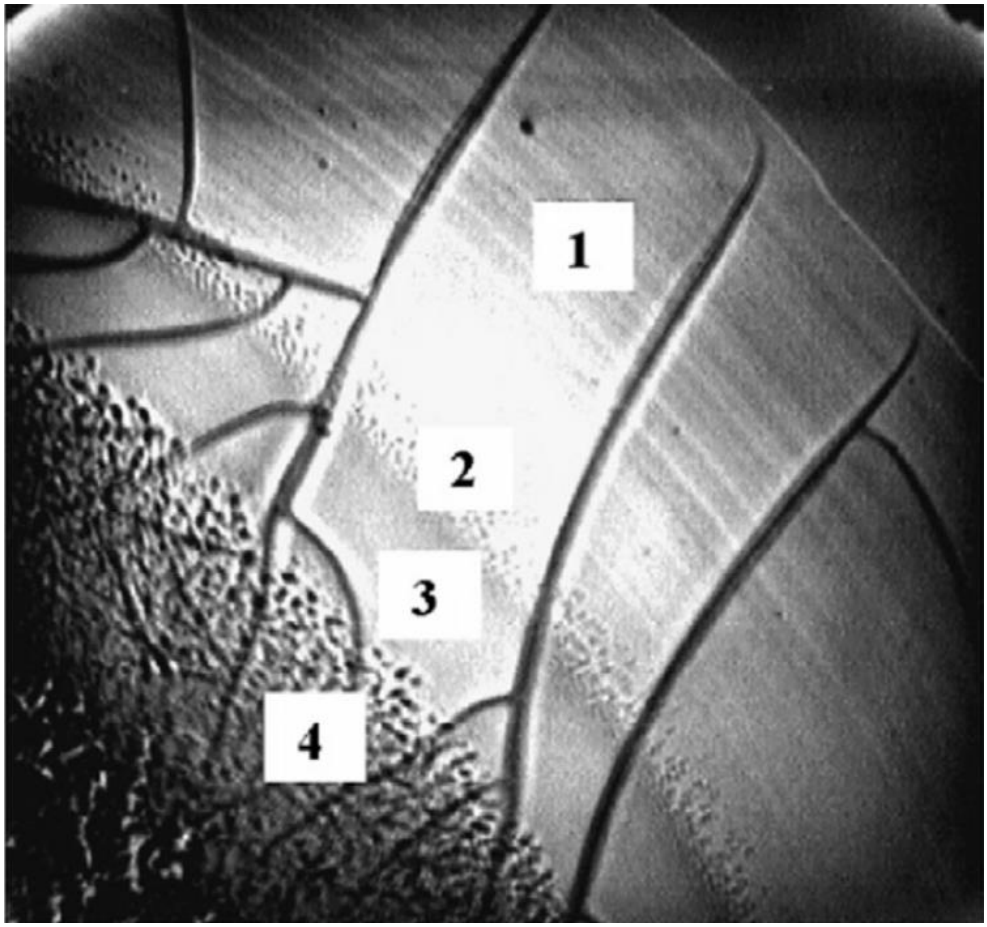


Figura 3: (1) filme homogêneo de proteína (2) precipitados de proteína (3) gel (4) zona de cristais de sais em gel de proteína. Fonte: (Cameron et al., 2018).

2.6 Periimplantite

A periimplantite de acordo com a última classificação das doenças e condições periodontais e periimplantares da Academia Americana de Periodontia e a Federação Européia de Periodontia em 2018 é caracterizada como uma alteração patológica dos tecidos ao redor dos implantes osseointegrados. Clinicamente, exibe sangramento a sondagem, profundidade de sondagem igual ou superior a 6 mm, nível ósseo de 3 mm ou mais apical á porção mais coronária da porção intraóssea do implante, deve-se considerar a recessão da mucosa marginal na avaliação clínica, ausência de sintomatologia dolorosa, eventual supuração e hiperplasia dos tecidos gengivais. Radiograficamente, pode apresentar uma lesão em forma de cratera ou taça pode ser observada além de exposição das roscas em consequência da destruição óssea (Steffens et al., 2018., Craveiro et al., 2015).

A formação de biofilme bacteriano no implante dentário pode induzir um fenômeno inflamatório e gerar um risco aumentado de mucosite, periimplantite e perda óssea. A periimplantite e a mucosite periimplantar têm uma elevada incidência na prática clínica (Jepsen et al., 2015). Quando não tratada adequadamente a periimplantite pode levar a extensa destruição do tecido de suporte ao redor do implante e consequentemente a perda do mesmo (Craveiro et al., 2015).

A profundidade de sondagem, o sangramento, a mucosa queratinizada, o fluxo do fluido sulcular e o infiltrado inflamatório servem como parâmetros para avaliar a saúde periimplantar (Steffens et al., 2018).

2.7. Métodos utilizados para análise estatística na espectroscopia

2.7.1 Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA)

O HCA é utilizado na análise estatística, pois o mesmo já define a classificação de diferentes grupos onde cada grupo pode conter diferentes características em comum (semelhanças) (Husson; Josse; Pages, 2010). O grande volume de dados e a necessidade de resultados rápidos fez-se desenvolver técnicas capazes de auxiliar no tratamento de tais dados usando o

método de aglomeração. O agrupamento se forma da definição de um critério de distância e aglomeração. Segundo Szymanska et al., 2011 a forma de estudo HCA é um bom modelo quando comparada duas variáveis e com bom resultado, com um poder de confiabilidade grande da amostra.

Há alguns tipos de distâncias comumente utilizadas como distâncias euclidianas, Minkowski e Mahalanobis. No entanto esses critérios podem ou não ser conhecidos. A distância euclidiana é definida como a distância entre dois pontos, que pode ser calculada pelo teorema de Pitágoras, e após a aplicação da equação é possível tornar este espaço métrico (Diers et al., 2019).

No agrupamento hierárquico, é possível escolher a distância, porém os critérios do agrupamento são determinados automaticamente, já no agrupamento não hierárquico é possível escolher os critérios como números de grupos que o cluster terá (Husson; Josse; Pages ,2010, Perrier et al., 2014).

O cluster é representado com uma forma semelhante à de uma árvore denominada dendrograma. Este método de análise de dados tem sido uma ferramenta eficiente para diagnóstico inclusive para diferenciação de tumores benignos e malignos e canceres em geral (Singh; Pandey, 2018; Lou et al., 2018; Roso-Llorach et al., 2018).

*2.7.*2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para classificação dos espectros, foi realizada a Análise dos Componentes principais PCA. O resultado obtido através do PCA foi apresentado por meio de um gráfico de Loading Plot, que correlaciona os PCs (componentes principais), ao deslocamento FTIR, contribuindo assim com a identificação das principais bandas que possibilitam a classificação entre os espectros das amostras.

O modelo de diagnóstico disposto foi à análise de regressão logística binária, observando-se os pares de concordantes fornecidos através do teste. Os resultados obtidos por meio desta metodologia de classificação aplicada aos espectros foram validados por meio da Curva Roc (*Recevier Operating*

Characteristic). Foi realizado o cálculo da área abaixo da curva ROC, para avaliar a sensibilidade e especificidade do estudo. As coordenadas deste gráfico (x e y) representam medidas de probabilidade, e consequentemente estes valores podem variar de zero a um, o que ocasiona no valor preditivo do modelo.

2.7.3 Método de Estudo PLS-DA

O PLS-DA é um método de discriminação utilizado para desenvolver modelos de classificação de dados multivariados de estudos cruzados, ou seja, uma configuração experimental na qual cada sujeito foi submetido a uma medição de controle e um tratamento (sem ordem aleatória) (Szymanska et al., 2011).

Primeiro, Importância Variável em Projeção (VIP) é uma soma ponderada de quadrados das cargas PLS levando em conta a quantidade de variação de intensidade espectral explicada em cada dimensão. A outra medida de importância é baseada na soma ponderada da regressão PLS. Os pesos são uma função da redução das somas dos quadrados ao longo do número de componentes PLS. Para análise de vários grupos, o mesmo número de preditores será construído para cada grupo e a média dos coeficientes de característica foi usada para indicar a importância geral baseada no coeficiente.

A discriminação de classe, desempenho da performance foi medido usando precisão de classificação, R_2 e Q_2 parâmetros. O primeiro é baseado em precisão da previsão. E o R2 parâmetro é a "qualidade do ajuste" ou variação explicada que é baseada na razão da soma dos quadrados entre grupos e da soma dos quadrados dentro do grupo. Por outro lado, Q_2 é a “qualidade da previsão”, ou variação prevista, calculada a partir da validação cruzada. Em cada rodada, os dados são previstos e comparados com os dados originais, e a soma dos quadrados dos erros é calculada sendo então somadas todas as amostras (*Predicted Residual Sum of Squares* ou PRESS).

Por conveniência, o PRESS é dividido pela inicial soma dos quadrados e subtraído de 1 para se assemelhar à escala do R2. Boas previsões terão baixo PRESS ou Q2 alto enquanto Q2 negativo significa que o modelo não é de todo preditivo ou é *overftted*. Dois quantificadores foram usados para medir a importância da frequência da banda vibracional no modelo PLS-DA.

2.7.4 Rstudio

O Rstudio é uma interface do software R, que foi utilizado para computação estatística e construção de gráficos e análise estatística. O programa possui diversos pacotes de análise de dados de diversas áreas de estudo, que é usado pela comunidade cientifica para tratamento dos dados da espectroscopia. Foram feitas todas as análises estatísticas dos dados como a remoção de linha de base dos espectros, a sua normalização e a média e também a análise hierárquica de agrupamentos chamada de (HCA), a análise de componentes principais (PCA), ou seja, as análises fundamentais para a obtenção dos resultados.

No apêndice 1 consta um maior esclarecimento sobre estatística descritiva e suas classificações como análise dos dados univariados e multivariados.

3. OBJETIVO

Objetivo principal:

Identificar os perfis salivares em saliva de pacientes com ou sem periimplantite e sua importância em relação à doença, por meio do FTIR/ATR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterizações dos pacientes

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade de Guarulhos - UNG (ANEXO A) sob o número 205/03. O protocolo do estudo foi explicado a cada um dos participantes e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado. Foi um estudo de caso controle, seguindo o estudo de Shibli et al., 2008.

As amostras de saliva foram coletadas em recipientes estéreis, no período da manhã, todos os pacientes estavam em jejum a mais de 8 horas e não houve qualquer estímulo para a coleta da saliva, foi solicitado no mínimo 3 ml de saliva de cada paciente, e foram imediatamente armazenados em tubos criogênicos, devidamente identificados, numerados e mantidos sob refrigeração em nitrogênio líquido durante o transporte. Em seguida foram armazenadas em ultra freezer (-80^{o}C) na Universidade Federal do ABC, campus Santo André, até o processamento das análises.

Quarenta pacientes de ambos os gêneros foram incluídos no estudo e divididos em dois grupos, grupo C (controle) e grupo P (periimplantite).

A periimplantite foi caracterizada por perda óssea em forma de taça, defeitos maiores que 3 mm e mucosa periimplantar inflamada, exibindo sangramento a sondagem ou presença de supuração (Mombeli et al., 1999). E a saúde clínica em um periodonto saudável, foi considerada de acordo com a Academia Americana de Periodontia 2018 como ausência de perda de inserção, profundidade de sondagem de até 3 mm, sangramento a sondagem em menos de 10% dos sítios e sem perda óssea radiográfica.

Os critérios de inclusão: os pacientes eram saudáveis e sem comprometimento sistêmico e deveriam ter pelo menos um implante osseointegrado, há pelo menos dois anos em função, sendo este implante unitário.

Os critérios de exclusão: pacientes com algum comprometimento sistêmico, ou menores de 18 anos, ou que tivessem tomado antibiótico ou anti-inflamatório no período de 6 meses antes do estudo ou ter recebido tratamento

periodontal ou terapia periimplantar neste mesmo período; que apresentasse um quadro de periodontite crônica moderada a severa como exemplo: supuração, sangramento a sondagem em mais de 30% dos sítios subgengivais ou qualquer sítio com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm, implantes com mobilidade clinicamente detectável (caracterizando a falta de osseointegração), implantes múltiplos, próteses implantosuportadas com pilares, parafusos ou bem como coroas cerâmicas ou resina quebradas, para evitar assim qualquer interferência oclusal e pacientes fumantes. Caso o paciente tivesse mais de um implante saudável foi considerado para o estudo o implante situado na região mais anterior.

4.2 Parâmetros clínicos avaliados

Os dados de cada paciente foram coletados assim como gênero e idades foram divididos em controle e periimplantite.

Foi avaliado o índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS), e nível de inserção (NI) que foram obtidos em 6 sítios de cada implante estudado (mesio-vestibular, bucal, disto-vestibular, distolingual, lingual e mesiolingual), por um examinador calibrado (Shibli et al., 2008). As medidas foram feitas usando uma sonda periodontal da Carolina do Norte (PCPNU-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

4.3 Preparo das Amostras Para a Análise de FTIR

As análises das amostras foram realizadas de acordo com o protocolo patenteado sob o número 2940916129424514/INPI. Registado como inventor HERCULANO DA SILVA MARTINHO e GABRIELLE LUANA JIMENEZ TEODORO NEPOMUCENO em 02/12/2021.

A metodologia de secagem envolveu a deposição de 1µL da saliva “in natura" sobre um substrato de platina (disco rígido inutilizado de computadores de mais de 5 anos) em condições de temperatura e umidade controladas.

Existem vários parâmetros que foram analisados para garantir a reprodutibilidade, entre eles estão: padrões de secagem, diluição da amostra, temperatura de secagem e a umidade relativa durante o tempo de secagem. Foram testadas algumas diluições como o que já está documentado seguindo a patente por a cima mencionada.

A literatura envolvendo biofluídos indica que a umidade relativa a 80% é a condição ideal de secagem, desta forma cria-se o ambiente ideal com o preparo da saliva com solução NaCl (cloreto de sódio), para evitar um efeito de anel de café *(Coffee ring*) e obter um biofilme homogêneo (Figura 5). Posteriormente foi colocado dentro do dessecador e mantido em equilíbrio por 24 horas, deixando a umidade relativa de 80%. A temperatura do ambiente foi controlada em 20ºC.

O sistema foi estabilizado e as amostras foram retiradas do ultra-freezer, descongeladas em temperatura ambiente de 25°C e depois de pipetados 1 µL de saliva nos substratos. As gotas foram preparadas em triplicata. A saliva já depositada no substrato foi então levada ao dessecador para que passassem pelo processo de secagem em umidade relativa controlada por 24 horas. Os substratos ideais devem ser resistentes mecanicamente, possibilitando boas imagens por reflexão no microscópio óptico e não oxidarem sob ação dos constituintes da saliva, por isso da escolha dos HD, pois os mesmos possuem na composição a platina.

Os substratos de platina após secos foram ser levados para a inspeção visual no microscópio óptico do laboratório da Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC (UFABC), porém as amostras não secaram da forma efetiva para que fosse feita esta análise no microscópio, portanto optou-se por fazer a análise com o auxílio da Reflectância Atenuada Total (ATR) para obter melhores resultados e uma maior confiabilidade dos mesmos. A metodologia do micro ATR é um complemento ideal para a Espectroscopia FTIR para a análise *in situ* em tempo real e monitoramento de reações químicas. As misturas de reação são densas, de modo típico e óptico, para a radiação de infravermelho médio. A profundidade restrita de penetração da energia infravermelha na solução de reação que está em contato com o

sensor ATR permite o registro de espectros FTIR de alta qualidade (Violet et al., 2019; Nasser et al., 2020). A análise do ATR é feita com uma ponta de diamante e com o laser de gás hélio-neon (He-Ne), radiação 632,8 nm, com potências da ordem de 0,3 a 0,6 Mw (Figura 4).

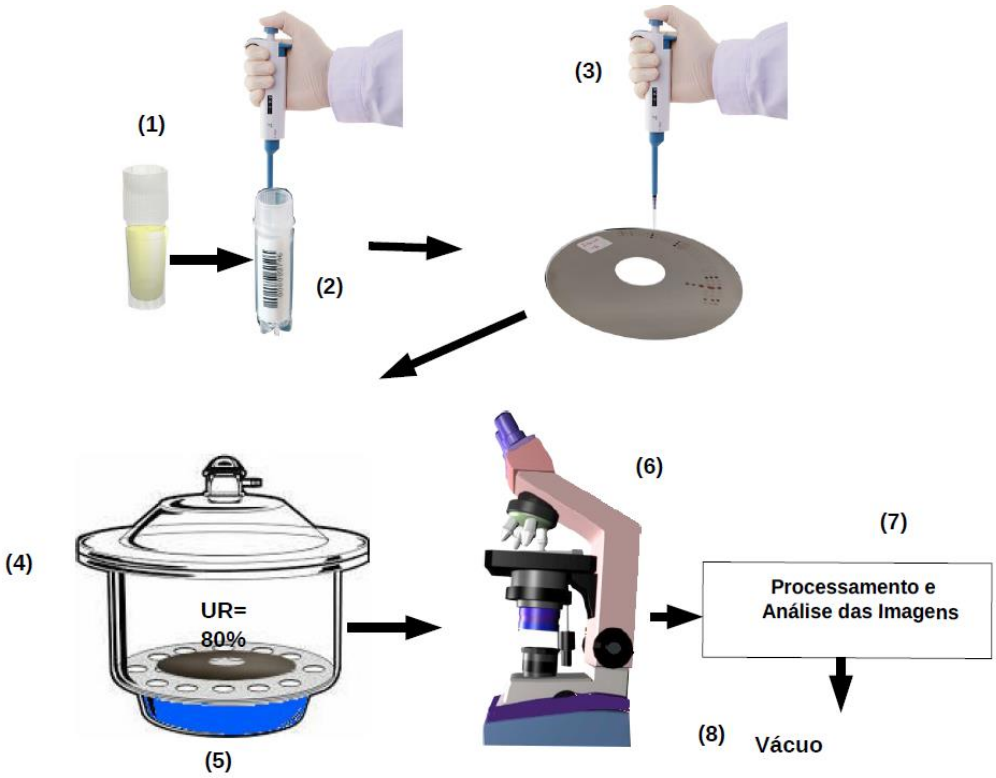


Figura 4: Esquema exemplificando o preparo das amostras. A saliva contida no tubo criogênico **(1)**, foram diluídas em outro tubo criogênico nas proporções mencionadas acima com o auxílio de uma micropipeta **(2),** alíquota de 1 ul foram transferidas para o substrato de Pt **(3).** Tal substrato foi acondicionado em um dessecador **(4)**, mantido em sala com temperatura controlada. Uma solução de NaCl **(5)** garantiu o controle de umidade relativa de 80%. Após a secagem, as gotas foram inspecionadas no microscópio óptico **(6)**, as imagens foram salvas e seguiram para análise **(7)**. A etapa de vácuo foi realizada antes das amostras serem submetidas a espectroscopia vibracional, para eliminar os resíduos de água, para não haver fluorescência **(8)**.

Fonte: Nepomuceno 2020.

Figura 5: Imagem do HD já preparado com as amostras depositadas.

Para a realização da espectroscopia vibracional e a aquisição dos espectros, a técnica que foi empregada foi à espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no modo micro. O equipamento foi o FTIR 660- FTIR 610 *agilent* (Figura 6).

Microespectrômetro Varian 610 FT-IR acoplado a um 640-IR. O espectrômetro FT-IR (detector bidimensional LN2 Ge) foi usado no modo de refletância para aquisição de espectros. A janela para aquisição de espectros foi de 150 mm^2, enquanto o espectro a resolução foi definido para 4 cm^{-1}. Ele opera em um comprimento de onda de 4000-400 cm^{-1}, o equipamento foi disponibilizado pela Central Multiusuário da Universidade do ABC, e posteriormente foi feita a análise com o auxílio da Reflexão Total Atenuada (ATR).

Figura 6: Imagem do aparelho FTIR utilizado.

Na figura 7: desenho esquemático mostrando a análise no ATR, e o acessório utilizado para a análise no ATR (Figura 8).

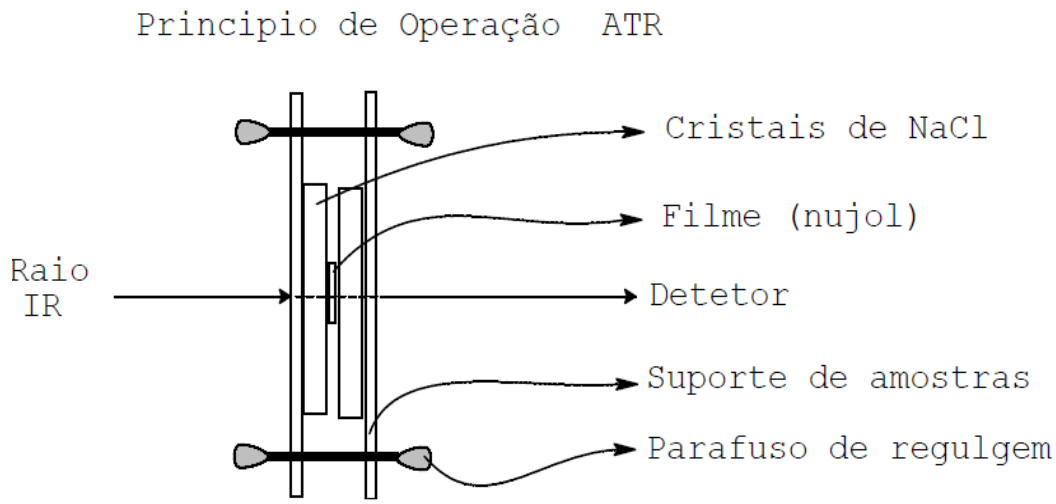


Figura 7: Exemplo de como é realizada a análise com o ATR. Fonte: Antônio Aarão Serra., 2020.

Figura 8 – Fotografia do Acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) para Micro FT-IR. Fonte: Silva de Carvalho., 2011.

Os espectros foram obtidos com *background* de 20 escaneamento, com número de varredura de 20 escaneamento e resolução de cm^{-1} e com um tempo total de varredura de 20 segundos em média. Todas as regiões tiveram os mesmos padrões de aquisição dos espectros e cada amostra foi realizada em triplicata e analisada.

4.4 Análise dos Dados

Foi realizada a análise de normalidade com o teste Kolmogorov-Smirnov para as variáveis, idades e os parâmetros periodontais. Para avaliar a diferença entre os grupos foram aplicados os testes t-Student e Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa GraphPad-Prism versão 9.5.1.

Todos os espectros foram pré-processados para torná-los comparáveis por análise estatística. A linha de base foi corrigida usando os mínimos quadrados, método de ajuste de curva polinomial conforme descrito por Lieber

e Mahadevan-Jansen (2003), usando o software RStudio. Todos espectros foram normalizados usando o mean centering, que é um padrão comum, método de escalonamento amplamente utilizado em espectroscopia vibracional e análise metabolômica (Hou et al., 2020; Morais et al., 2020; Nepomuceno et al., 2021; Nepomuceno et al., 2023). Análise de componentes principais (PCA), parcial análise discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA) e operação do receptor a análise da curva característica (ROC) foi utilizada para avaliar a precisão do diagnóstico de uma banda vibracional específica como biomarcador. Esta opção foi implementada usando o Pacote MetaboAnalystR rodando no RStudio.

4.4.1. Agrupamento Hierárquico

Na análise de cluster hierárquica aglomerativa (HCA), as amostras foram combinadas até que cada uma pertença a um cluster. Foi utilizada a distância euclidiana como uma medida de similaridade e Correlação de Pearson como correlação de posto. O algoritmo de agrupamento foi a ligação média. Um mapa de calor foi usado como uma representação visual além dos dendrogramas. O agrupamento hierárquico foi realizado com a função hclust no pacote stat no RStudio. O HCA foi usado para inspeção dos dados clínicos.

5. RESULTADOS

5. 1 Resultados clínicos

Foram avaliados 40 pacientes divididos em dois grupos: o Grupo controle (C) com 18 pacientes sem doença periimplantar e o Grupo periimplantite (P) com 22 pacientes diagnosticados com periimplantite.

Duas amostras do estudo foram excluídas, sendo uma amostra do grupo C (controle) e outra do grupo P (periimplantite), pois elas apresentaram alteração na leitura do espectro no microscópio, por isso foram consideradas inaptas para o uso no estudo, (apresentaram excesso de água o que ocasionou o efeito de fluorescência e alteração na leitura da amostra no FTIR/ATR).

Os parâmetros clínicos analisados foram a presença ou ausência de placa (IP), índice gengival (IG), a profundidade de sondagem (PS), e nível de inserção (NI). De acordo com os dados obtidos, os dados clínicos foram maiores no grupo dos pacientes periimplantite quando comparado com o grupo controle com diferença significante, exceto pelo dado de índice de placa que o mesmo não teve diferença estatística quando comparados os dois grupos (Tabela 1).

A tabela 1 descreve os dados demográficos e os parâmetros periimplantares avaliados.

Tabela 1. Dados demográficos e dados de parâmetros clínicos/ periimplantares dos pacientes analisados

	Controle	**Periimplantite**	
N	17	21	P
Média de Idade	46,41±16,86	53,4±12,11	0,1433[1]
Gênero	7M /10 F	3M / 18F	
Índice de placa	0,43 ± 0,43	0,36 ± 0,42	0,7543[1]
Índice gengival	0,26 ± 0,35	0,53 ± 0,36	**0,0241**[2]*
Profundidade de sondagem (mm)	3,41 ± 0,99	5,07 ± 2,28	**0,0083**[2]*
Nível de inserção (mm)	0,18 ± 0,76	5,09 ± 2,29	**<0,0001**[1]*

[1] teste Mann-Whitney; [2] teste t-Student * diferença significativa

5.2 Espectroscopia Vibracional

Após a análise do FTIR foi gerado o gráfico do espectro médio, tanto para o grupo controle quanto para o grupo periimplantite. É possível avaliar as regiões de picos exemplificadas nas regiões com número de onda entre 1000 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} e outro pico importante variando de 1400 cm^{-1} e um último pico importante variando de 1700 a 1800 cm^{-1}.

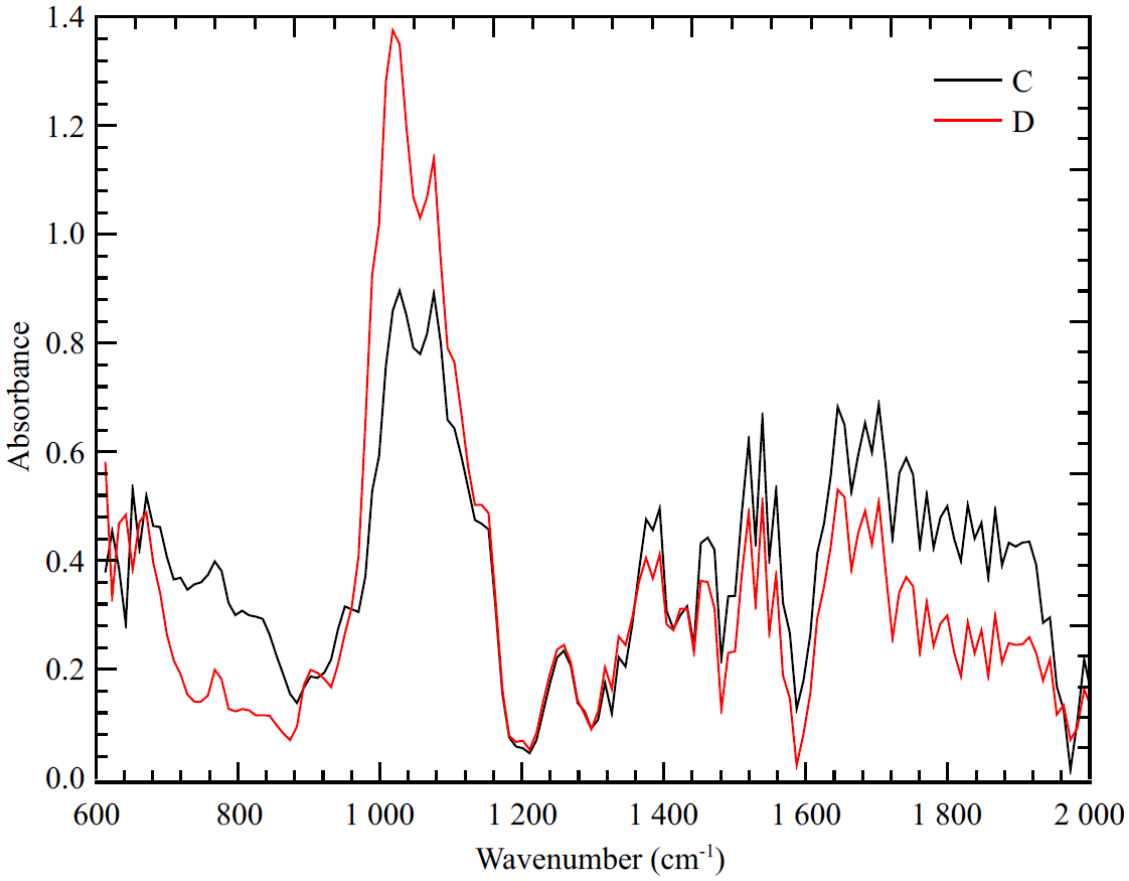


Figura 9: Gráfico representando o espectro médio, com os dos dois grupos analisados e região de impressão digital variando de 600 a 2000 cm^{-1}. exemplificando os dois grupos, onde o grupo controle é representado pela cor preta e o grupo periimplantite na cor vermelha.

Foi realizada a normalização do espectro médio, representado na Figura 10 onde a primeira vista os espectros mostram variações de intensidade nas regiões de 1020 cm^{-1} (DNA)' 1040 cm^{-1}(alongamento CO ribose) ,1230 cm^{-1} (alongamento PO_2 assimétrico e sobreposição da proteína amida III e do vibração de fosfato de ácido nucleico), 1390 cm^{-1} (partícula de carbono), 1430 cm^{-1} (lipídios, ácidos graxos), 1500 cm^{-1} (Vibração de curvatura CH no plano do anéis de fenil- Flexão no plano CH), 1590 cm^{-1} (Trecho de anel CC de fenil C),1650 cm^{-1} (Absorção de Amida I), 1700 cm^{-1} (A região das bases ésteres de ácidos graxos)(Movagaghi et al., 2008) (Figura 10).

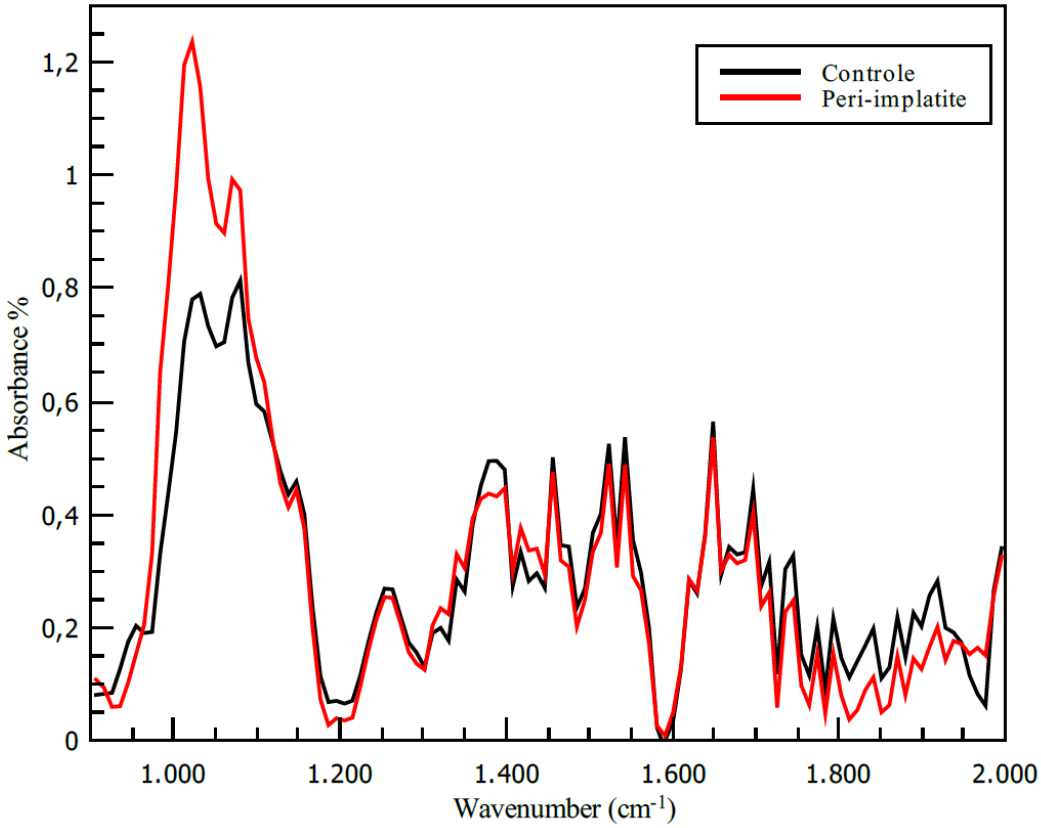


Figura 10: Gráfico representando o espectro médio, após a sua normalização, com os dos dois grupos analisados e região de impressão digital 800 a 2000 cm^{-1}.

Foi realizada uma análise da dispersão no conjunto dos dados brutos espectrais para identificar espectros anômalos, *outliers* ou dados tendenciosos. O PCA foi calculado nos dados brutos e centrado na média, o Q residual (reduzido) versos o T^2 de *Hotelling* foi verificado (Figura 11) para encontrar residual Q e pontuação T^2 discrepantes. Dados fora do limite de confiança de 95% foram considerados *outliers* e removidos da análise posterior.

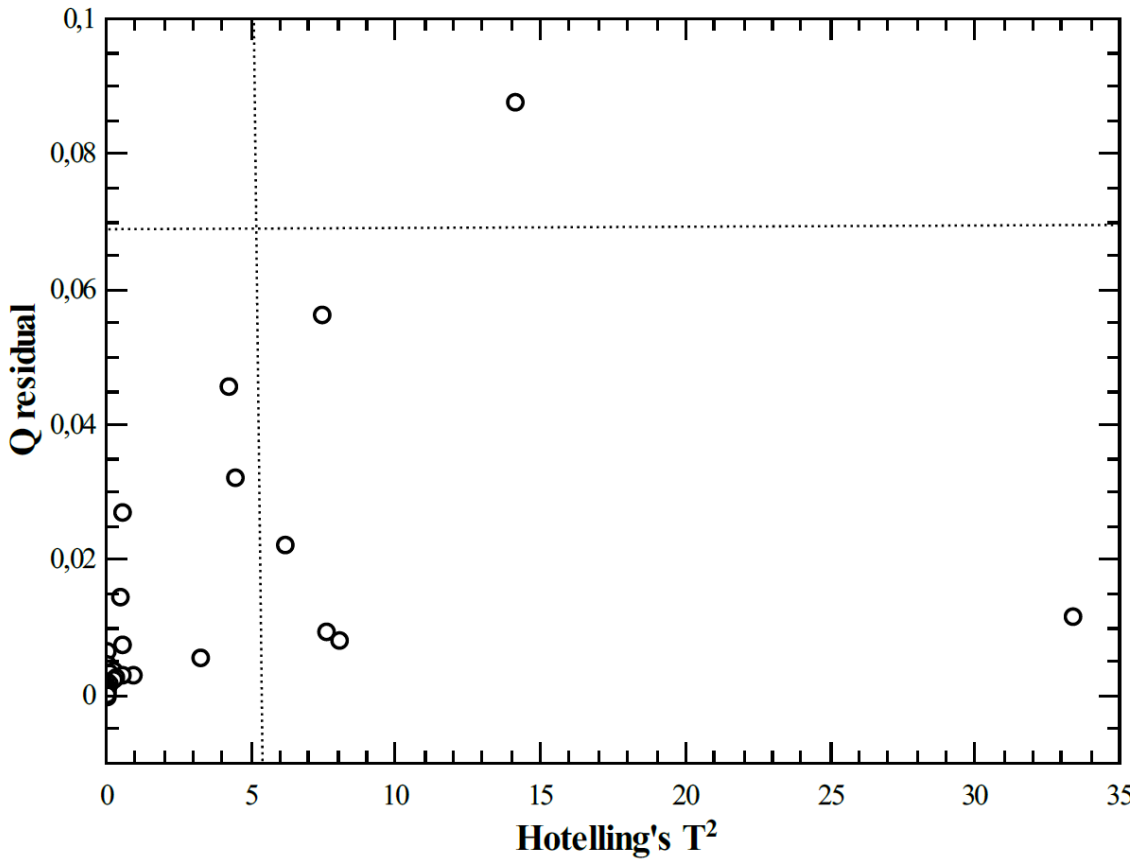


Figura 11: *Outliers* identificados na inspeção do Q residual versus *Hotellings* T^2

Os *outliers* estão indicados com * nas linhas verticais e horizontais representam o limite de confiança 95% (Hotelling´s) e 5% (Q residual).

Para a classificação dos espectros FTIR foi realizada a Análise dos Componentes Principais (PCA). Após a obtenção dos dados da PCA foi realizado um teste sobre estes dados para verificação dos autovalores relacionados aos PCs, com o objetivo de verificar quantos PCs deveriam ser retidos na análise. No presente estudo esta dobra foi evidenciada no PC05, fazendo com que a análise de regressão logística binária para separação das amostras de C e P fosse realizada utilizando os CINCO primeiros PCs.

As figuras 12, 13 e 14 mostram os pares de pontuação até o quinto componente principal (PC) para todos os grupos. No primeiro momento a combinação incluindo cinco componentes é possível discriminar ambos os grupos. A precisão da classificação PLS-DA foi de 81% quando R2 70% enquanto Q2 tem um valor muito próximo se comparado com a combinação de três componentes. No entanto para o modelo usando os grupos, obtivemos o melhor desempenho da classificação PLS-DA, com cinco componentes já que foi observado uma precisão de 81%.

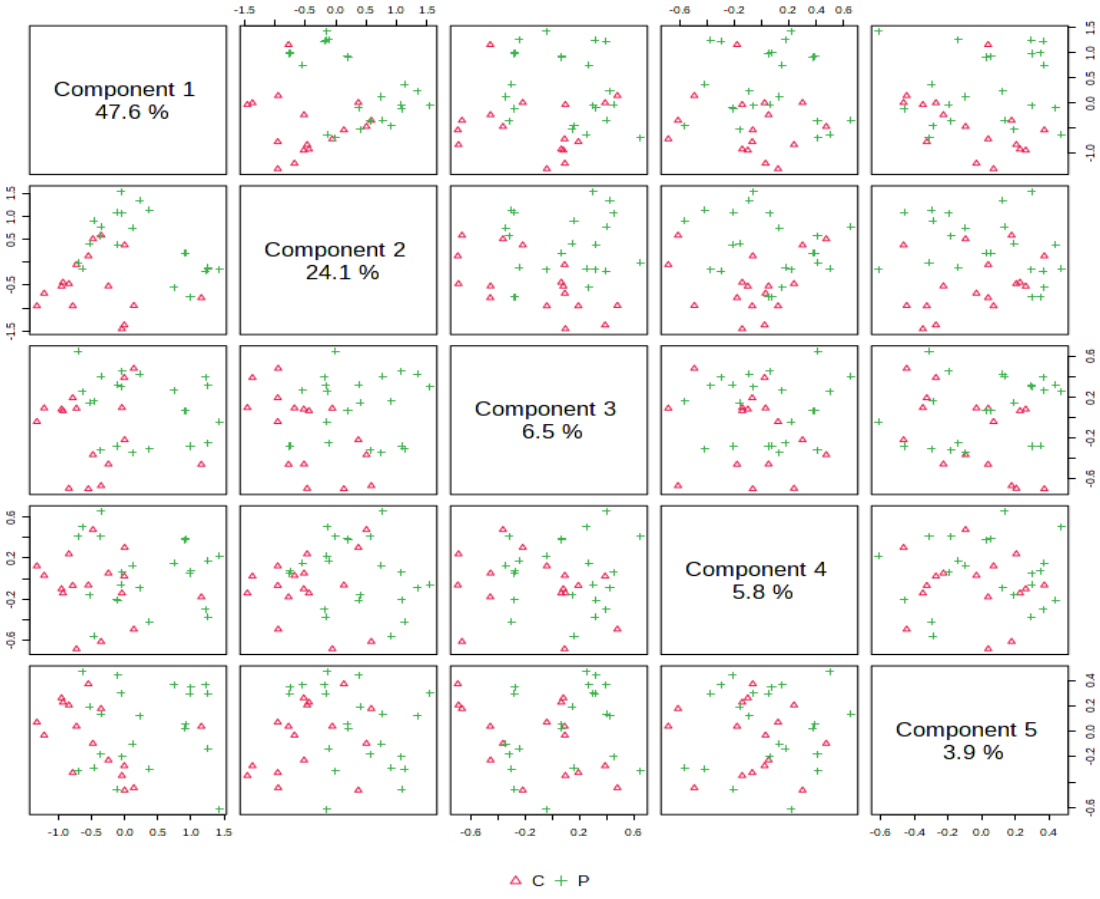


Figura 12: Gráfico de componentes com as suas porcentagens de acordo com a quantidade de componentes.

O valor da Acurácia com 5 componentes foi o que apresentou um valor maior se comparado com os grupos com menos componentes, e o valor de Q2 e R2 para os cinco componentes também são maiores em comparação. Em

seguida é apresentado o gráfico com as informações e a performance com os cinco componentes.

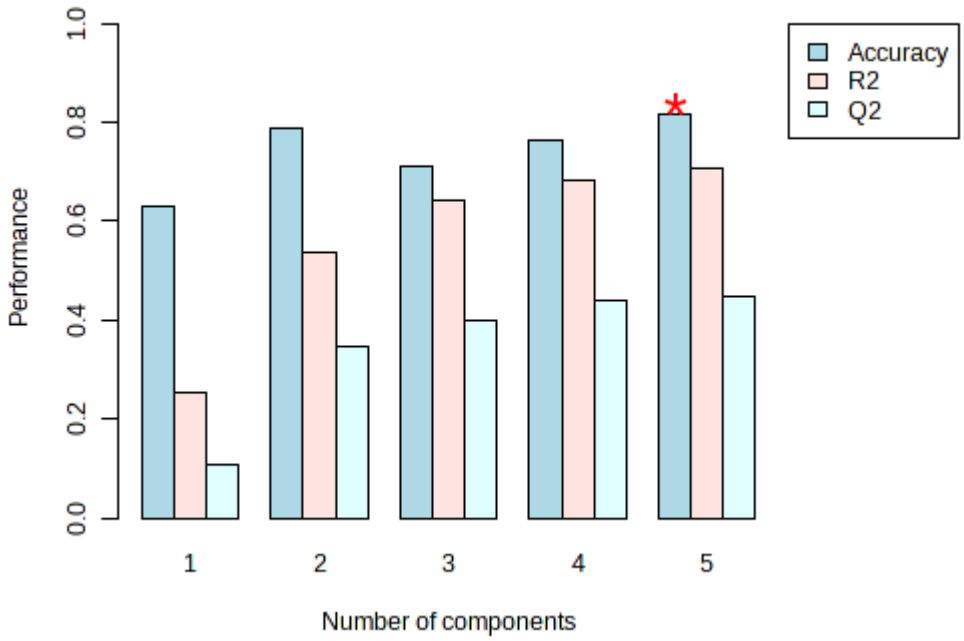


Figura 13: Gráfico com os componentes e com a determinação dos fatores avaliados e da superioridade do grupo com cinco componentes.

Medida	**1 COMPS**	**2 COMPS**	**3 COMPS**	**4 COMPS**	**5 COMPS**
PRECISÃO	61%	78%	71%	76%	81%
R2	25%	53%	64%	68%	70%
Q2	10%	34%	40%	44%	44%

Figura 14: Quadro com as informações da acurácia e de R2 e Q2 de acordo com cada grupo.

Na análise feita através do Vip Score os valores maiores que 2 são considerados valores bons. Através desta análise foi possível avaliar as bandas e os dados clínicos com a representação em valores e escala de cor.

Os dados clínicos aparecem com valores maiores que 2 assim como as bandas mas, quando comparada a escala de cor, o IP (índice de placa) aparece alterado quando confrontado ao restante dos dados clínicos nos dois grupos estudados.

O índice de placa esta com uma intensidade de cor leve no grupo periimplantite ao contrário dos outros dados clínicos, conforme o que está exemplificado na (Figura 15).

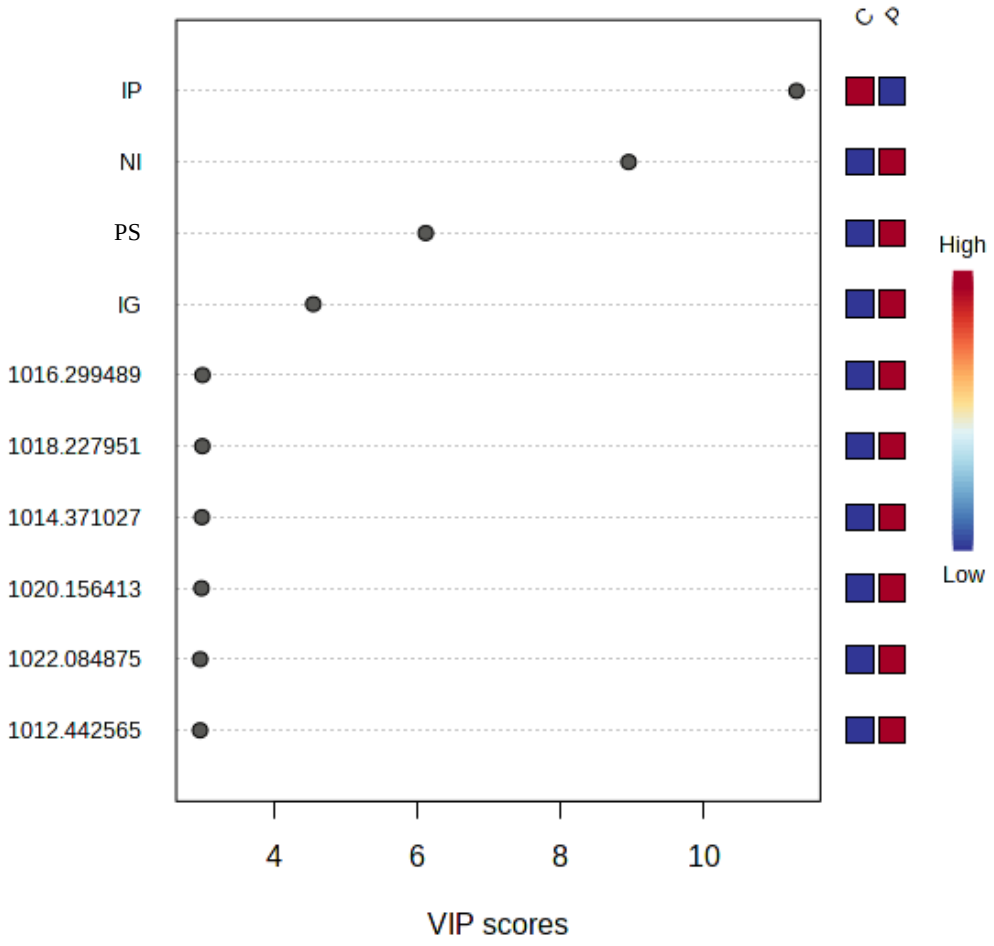


Figura 15: Vip score pontuação para bandas estatisticamente relevante, discriminado os grupos (C) controle e (P) periimplantite.

Os mapas de calor para os dados espectrais gerais (Figura 16) mostram características qualitativas interessantes. Existem dois grupos de pacientes representados pelo cluster esquerdo e direito. É possível observar que os pacientes periimplantite estão agrupados de forma contínua e o paciente controle está agrupado, mas disperso entre os pacientes doentes, mas ainda de forma contínuo, quando levado em consideração os aspectos clínicos investigados é possível notar uma grande alteração de coloração referente à intensidade de cada um dos parâmetros avaliados e os grupos pertinentes, podendo ser relacionando a cada um dos pacientes do estudo. É possível verificar que foram separados os dados clínicos e as bandas mais significativas é possível notar que há uma separação nítidas dos dados quanto ao controle e doente, e na escala de variação de coloração, mantém uma mesma intensidade, indiferente ao grupo pertencente, exceto quando comparado o índice placa, onde o mesmo manteve-se em uma grade de intensidade menor se comparado ao restante dos dados clínicos. Pode ser avaliado também as bandas com maior alteração juntamente com as características clínicas e a qual grupo a mesma pertence.

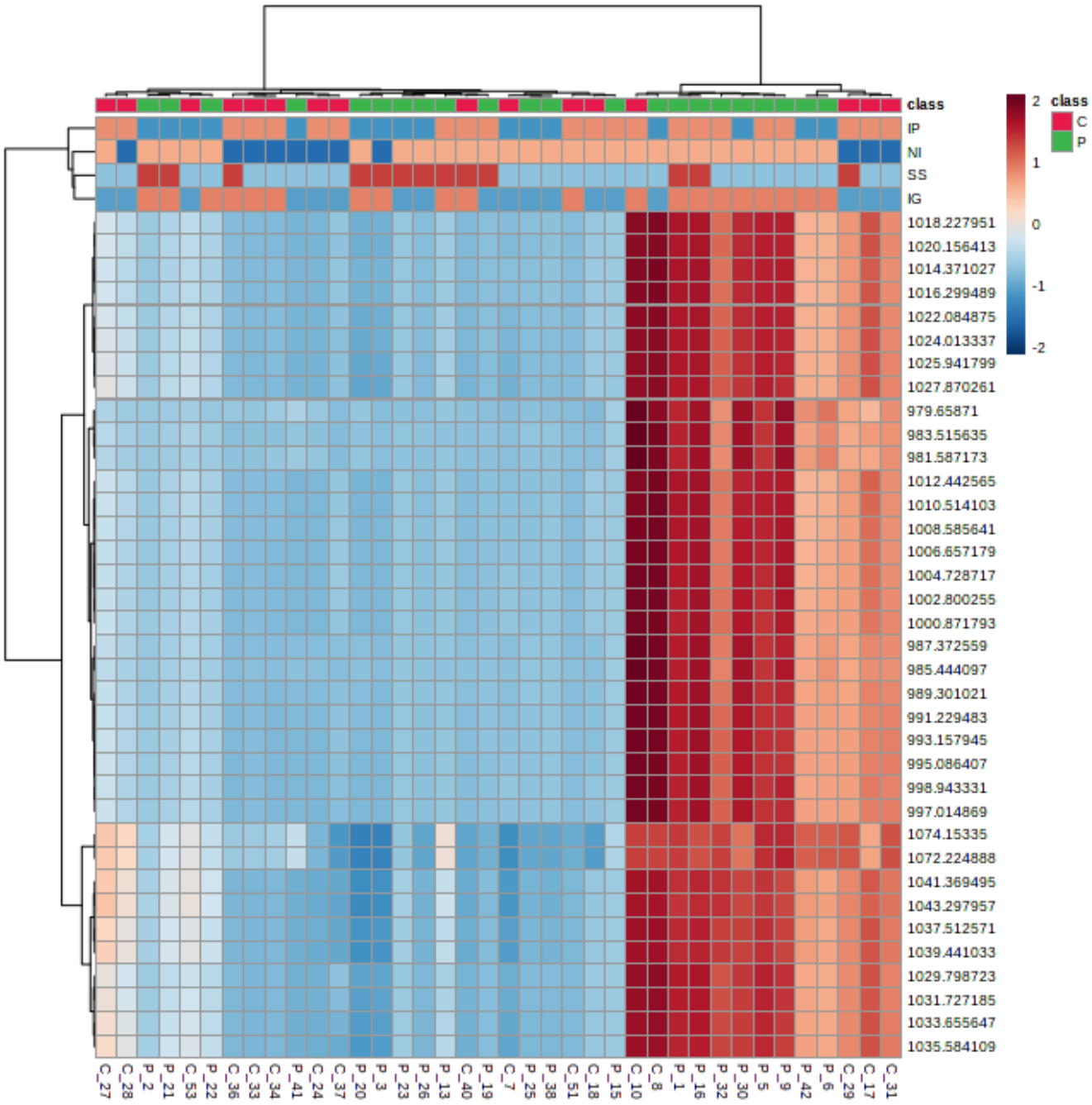


Figura 16: Mapa de calor para dados espectrais considerando a discriminação de grupo e característica clínica de cada um, a separação pelo grupo e as principais bandas.

Um resumo das atribuições dos principais números de onda e seus respectivos modos vibracionais e fontes moleculares que compõem os espectros originais da saliva estão apresentados na Tabela 2. De maneira

geral foi possível verificar que as médias do infravermelho exibem as bandas, como sendo as mais significativas 1558, 1698,1733, 1749, 1760, 1772,1835, 1845, 1859 cm^{-1}, e com uma acurácia de mais de 70%. Estas bandas estão relacionadas ao alongamento simétrico de CO-O-C juntamente com flexão CO da banda e C-OH de carboidratos e fosfato, região de estiramento de fosfodiésteres, alongamento de lipídeos e a região das bases e ésteres de ácidos graxos.

Sendo assim a presença de marcadores espectrais como a banda 1558 cm^{-1} com assinatura de um anel aromático amida II, e a sua biomolécula sendo o triptofano, a banda 1698 cm^{-1} tem assinatura espectral de $C=C0_2$ referente a timina e composto biomolecular as bases purínicas , a banda representada por 1733 cm^{-1} e 1749 são éster de lipídeo C=O vibração de triglicerídeos e polissacarídeos, lipídeo, ácidos graxos, é representada como uma banda de absorção de éster de ácido graxo, a banda 1760 cm^{-1} representada como uma banda $C=CO_2$ guanina e C=O timina, biomoléculas referentes ao DNA e RNA. As bandas 1772 cm^{-1} 1845 cm^{-1} e 1859 cm^{-1} têm como assinatura a histidina e como biomolécula o imidazol, e a banda 1835 cm^{-1} é referente ao N_20

Para avaliar a especificidade e a sensibilidade do modelo de diagnóstico foi realizada a curva ROC, que mostrou um valor preditivo do modelo correspondente à área sob a curva, sendo 0,79 para a região de *Fingerprint.*

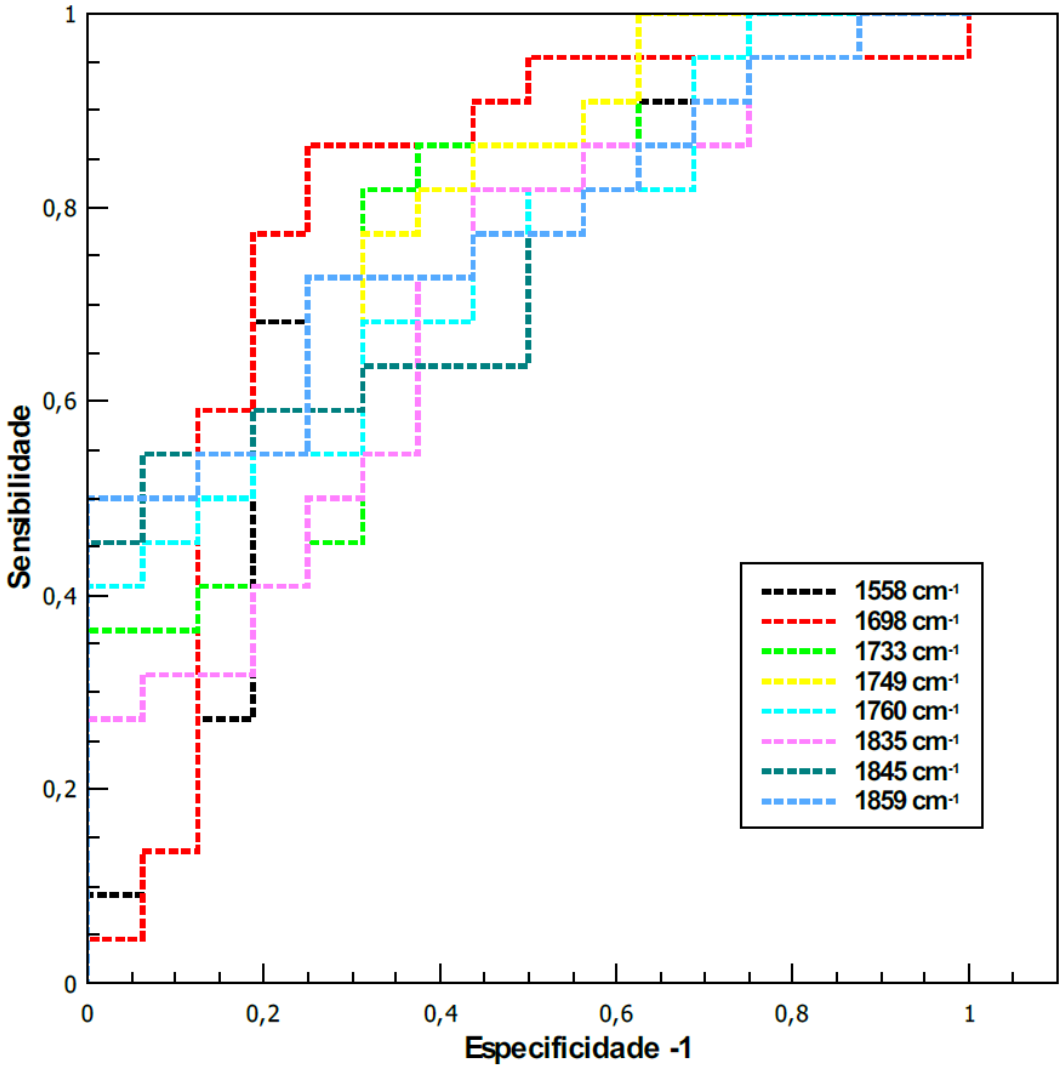


Figura 17: Bandas com maior relevância de acordo com o vip score (Curva ROC).

Para classificação dos espectros, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Os resultados da PCA foram apresentados por meio do gráfico de *Box Plot*, que confrontam os PCs (componentes principais) ao deslocamento FT-IR, favorecendo a identificação das principais bandas que possibilitaram a classificação entre os espectros das amostras.

Na sequência é apresentado como resultado as principais bandas e um gráfico de box plot, onde é possível analisar de forma estatística cada uma delas separadas, levando em consideração o grupo C e P e a sua relevância em cada banda.

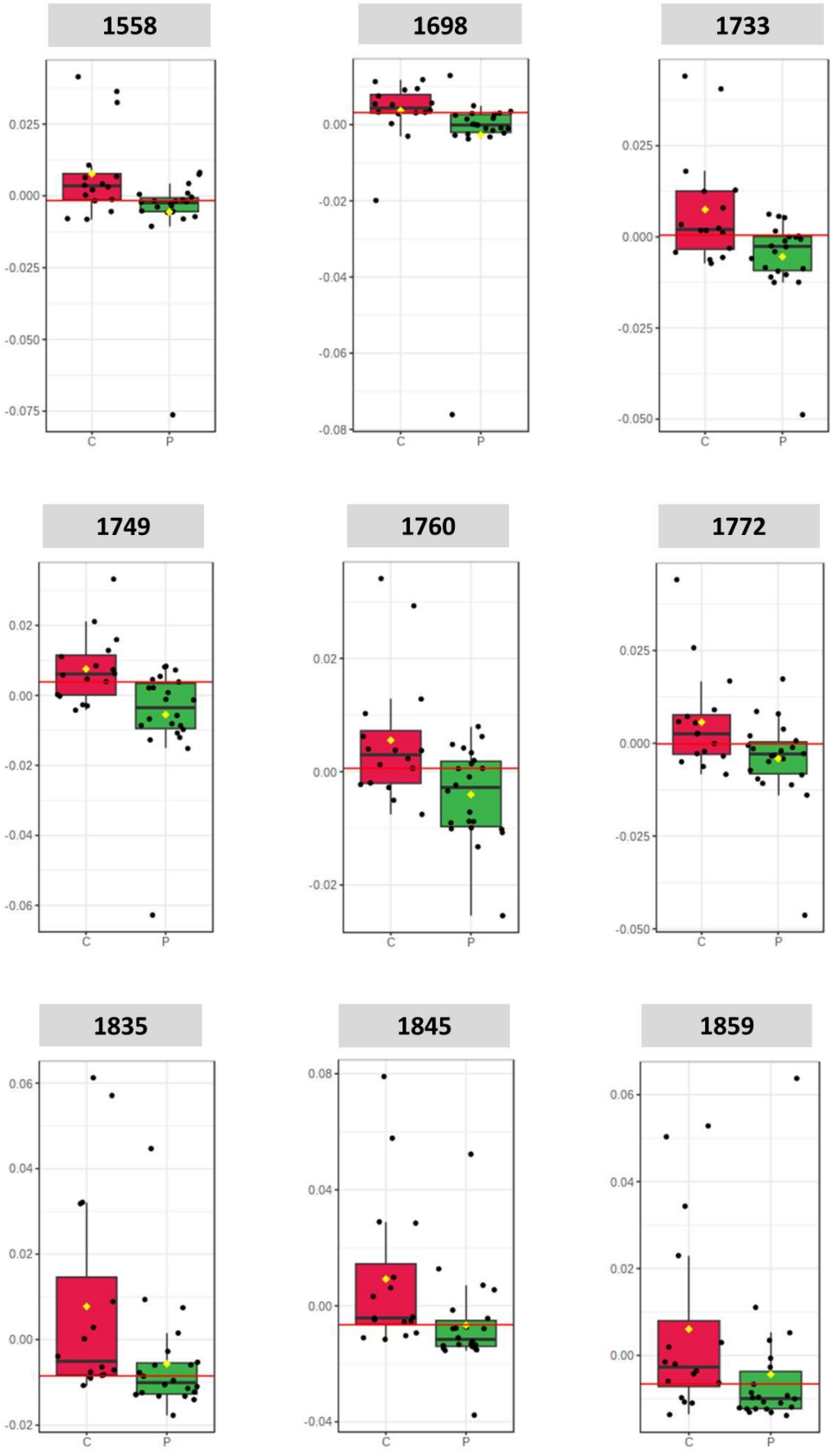

1558
0.025
0.000
-0.025
-0.050
-0.075
C
P
1698
0.00
-0.02
-0.04
-0.06
-0.08
C
P
1733
0.025
0.000
-0.025
-0.050
C
P
1749
0.02
0.00
-0.02
-0.04
-0.06
C
P
1760
0.02
0.00
-0.02
C
P
1772
0.025
0.000
-0.025
-0.050
C
P
1835
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
C
P
1845
0.08
0.04
0.00
-0.04
C
P
1859
0.06
0.04
0.02
0.00
C
P

Figura 18: Box plot para candidatos chave de banda vibracional a biomarcadores espectrais apresentando bom poder preditivo (AUC > 0,70).

A área sob a curva ROC (AUC) foi calculada para cada banda vibracional contribuindo para a discriminação entre (C) controle e (P) periimplantite; foram consideradas as bandas-chaves com uma boa intensidade apresentando boa precisão e sendo consideradas aceitáveis para biomarcadores (AUC> 0,70), são apresentados na figura 18. As atribuições correspondentes estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Atribuições de cada Banda significativa.

Bandas cm1	*Acurácia %*	*Atribuição*	*Biomoléculas*	*Referências*
1558	74	Anel aromático, Amida II	Triptofano	Nepomuceno et al., 2021
1698	79	C=CO_2 guanina, C=O timina	Bases purínicas	Dovbeshko, Gridina, Kruglova, e Pashchuk, 1997
1733	76	Ácidos graxos, C=O Timina	Polissacarídeo	Yoshida, et al., (1997)
1749	80	Ácidos graxos, C=O Timina	Polissacarídeo	Shetty, et al., (2006)
1760	75	C=CO_2 guanina C=O Timina	DNA, RNA	Nogueira et al., 2022
1772	70	Histidina	Imidazol	Nepomuceno et al., 2023
1835	73	Histidina	Imidazol	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924203199000119
1845	76	Histidina	Imidazol	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924203199000119
1859	70	Histidina	Imidazol	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924203199000119

Os principais espectros demonstrados acima foram considerados com uma acurácia maior de 70% e com a sua biomolécula definida, sendo elas histidina, ácidos graxos, anéis de base, triptofano, éster de lipídeos, sendo que todas foram estabelecidas com base em referencias literárias específicas para cada uma delas. (Tabela 2).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos com o uso da biopsia óptica estão sendo realizados, com o intuito de normalizar as técnicas e levar para prática in vivo. Alguns autores usam a técnica in vivo como a espectroscopia de Raman (Schwarz et al., 2009; Baker et al 2016., Baker et al 2018.Baker et al 2000).

O presente estudo avaliou saliva de pacientes com e sem periimplantite através do uso do FTIR/ATR. Embora muitos estudos tenham avaliado a saliva de paciente com periodontite e pacientes saudáveis, para análise dos componentes salivares com o auxílio do FTIR (Kuboniwa et al 2016., Liebsch et al., 2019., Borilova et al., 2020), até o dado momento este é o primeiro estudo em que é realizada esta análise com a doença periimplantar.

Nossos resultados apresentaram diferenças entre os grupos. Um total de 38 amostras foram avaliadas, aplicando a espectroscopia FTIR-ATR, a qual é conhecida por sua utilidade em detectar alterações a nível molecular. Com base nisso comparamos os espectros da saliva destes dois grupos de pacientes com e sem periimplantite e identificamos potenciais diferenças.

Segundo o estudo Beyer-Hans et al., 2020, o mesmo afirmou que o FTIR/ATR tem uma aplicabilidade escassa no campo da periodontia, mas o mesmo está sendo usado combinado com a análise multivariada com sucesso em ambientes médicos para o diagnóstico de várias doenças. Os achados atuais estão de acordo com publicações recentes que mostram a aplicabilidade da espectroscopia de infravermelho para a caracterização de outras formas de doenças periodontais além da periodontite, usando tanto o tecido periodontal, periimplantar ou o fluído gengival crevicular.

As amostras de periimplantite e controle exibiram diferentes vibrações, como estiramento, flexão, deformação ou uma combinação de vibrações, tais estão diretamente relacionadas com a estrutura molecular das biomoléculas constituintes (Borilova et al., 2020), exibindo assim, informações complementares para elucidar a saliva como método de diagnóstico ao exame clínico. A periimplantite é uma doença crônica, inflamatória que pode levar a

perda dos implantes dentários (Chen et al., 2015; Kozak et al., 2020) apresentando alteração nos ácidos nucléicos, que estão diretamente envolvidos com o processo de síntese e multiplicação celular e nas fibras colágenas.

As atribuições de pico demonstram mais variação na distribuição de DNA (ácido desoxirribonucleico) e lipídeos, como por exemplos nas bandas 1698, 1733, 1749 e 1760 cm^{-1} assim como relatado no estudo de Shetty et al., 2006, onde foi feita a investigação de carcinogênese de esôfago, através da espectroscopia de Raman, o que corrobora com os achados de que na saliva é possível identificar porções do DNA e lipídeos com confiança. Segundo Nepomuceno et al., 2023 a banda 1698 é atribuída a guanina C=0 que compõem o DNA e são aumentados em processos de carcinogênese. E assim como o estudo de Xiang et al (2010), a banda 1713 cm^{-1} é representada como uma fita de DNA com pares de base, onde houve um aumento das concentrações de DNA no fluído crevicular gengival em pacientes com alterações periodontais em comparação aos pacientes saudáveis, O aumento do conteúdo de DNA nas amostras de fluido crevicular gengival inflamatório pode sugerir uma condição provocativa durante a condição inflamatória, com leucócitos ativos, bactérias e células epiteliais eliminadas nas amostras de fluido crevicular gengival.

Segundo o estudo de Xiang et a, 2010, foram avaliadas 190 amostras de fluido crevicular gengival com FTIR para identificar alterações moleculares especificas da periodontite. Analisaram 64 amostras de periodontite, 61 gengivites e 65 saudáveis, demostraram um aumento do componente de DNA no fluido crevicular gengival de sítios de gengivite e periodontite, em relação aos sítios de controle saudáveis. Isso foi devido a uma combinação de um aumento causado pela inflamação na migração de leucócitos para o fluido crevicular gengival, particularmente neutrófilos, além de um aumento no tecido epitelial renovação, refletindo a remodelação contínua do tecido e o próprio estímulo inflamatório, causado pelas bactérias da placa bacteriana. Esta relação pode ser constata também quando analisada a periimplantite, pois há mesma exibiu marcadores de DNA alterados como as bandas 1733, 1749 e

1760 cm $^{-1}$ (bandas próximas ao estudo de Xiang) o que poderia explicar o fato da sua alteração estar relacionada doença perimplantar, pois a mesma e caracterizada com uma alteração inflamatória dos tecidos ao redor dos implantes.

Já no estudo de Fujii et al., 2016 onde foram analisados 10 pacientes com doença periodontal e 12 pacientes saudáveis através da analise de saliva com o auxilio do FTIR para a diferenciação de bandas da doenças. Encontraram que o pico mais característico foi entre 1800 e 1500 cm^{-1} onde as características espectrais são denominadas pela banda de absorção de estiramento C=O éster de carbonila representada pela banda 1738 cm^{-1} .A banda Amida I, que é representada pelo alongamento C=O foi observada nos comprimentos de onda de 1700 cm^{-1} e 1600 cm $^{-1}$, e a banda Amida II foi observada entre 1600 cm $^{-1}$ e 1500 cm $^{-1}$. As propriedades da saliva em pacientes com a doença periodontal difererem da condição normal. Reconheceram que bactérias gram negativas, como Porphyromonas Gingivalis, Agregatinobacter Actinomycetemcomitans e Provotella Intermedia se propagam nas bolsas do sulco gengival, o que corrobora com os achados em nosso estudo referente aos comprimentos de onda relacionados a periimplantite e também com os achados no estudo de Shibli et al.,2008.

A espectroscopia infravermelha é cada vez mais reconhecida como uma modalidade alternativa para determinação precisa da peroxidação lipídica em diversas amostras biológicas (Sills et al, 1994). O aumento do estresse oxidativo é consequência do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou da capacidade atenuada de eliminação de espécies reativas de oxigênio, resultando em danos teciduais refletidos no aumento da peroxidação lipídica. A perda de instauração durante as reações de peroxidação lipídica foi compensada pela presença de ligações duplas nos produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído, aldeídos lipídicos e radicais alquil. É bem reconhecido que a peroxidação lipídica aumenta acentuadamente durante a inflamação periodontal.

Tsaie 2005 relatou que a quantidade total de peroxidação lipídica correlacionou-se positivamente com vários parâmetros clínicos da doença, indicando que quanto mais grave a inflamação do tecido periodontal, maior o nível de peroxidação lipídica. Além disso, o estresse oxidativo periodontal pode até ter consequências sistêmicas, com concentrações mais altas de peroxidação lipídica no sangue observadas em um modelo de periodontite em ratos, em comparação com animais de controle periodontalmente saudáveis.

Houve diferença nos dados clínicos entre os dois grupos, exceto o índice de placa, que como observado clinicamente e constatado através do heatmap, não foi um fator decisivo quando se trata de periimplantite. O estudo de Shibli et al., 2008 traz como os principais patógenos encontrados no grupo periimplantite o P. gingivalis, T. forsythiae, Treponema denticola e P. nigrescens, e faz um alerta que no biofilme supragengival de implantes com doença, pode funcionar como um reservatório de espécies patogênicas e contribuir para a reinfecção de áreas já tratadas, assim como o Hajishengalli et al.,2004 no seu estudo relata a virulência do patógeno P.gingivalis, associado aos implantes e reforça os nossos achados em relação ao índice de placa, que o mesmo não seria um fato isolado para a ocorrência da periimplantite.

Sugimoto et al., 2010 utilizaram a saliva como biofluído para avaliação de marcadores específicos para doenças como câncer de mama, pâncreas e boca, problemas periodontais, foi possível fazer a análise dos metabólicos envolvidos em cada uma das doenças. Avaliaram 215 indivíduos sendo 69 com câncer oral, 30 com câncer de mama, 18 problemas pancreáticos, 11 pacientes com problemas periodontais e 87 controles saudáveis. Foram encontrados 57 metabólitos para discriminar indivíduos com doença periodontal e destes 27 metabólitos foram relatados como biomarcadores candidatos importantes para a doença periodontal o triptofano, histidina, carnitina, alanina, ácido gutâmico, ácido pipecólico, poliamina treonina. As principais alterações verificadas a partir da análise dos espectros envolveram principalmente alterações inflamatórias com os marcadores como o triptofano e a histidina. O triptofano foi associando no estudo de Nepomuceno et al., 2021 que avaliaram os marcadores de doença renais, o mesmo se mostrou efetivo como marcador para o

desenvolvimento de doenças cardíacas em pacientes com problemas renais. O triptofano é um precursor da serotonina e da melanina.Que comparado com o estudo em questão o triptofano e a histidina também foi uma biomolécula importante como biomarcador para pacientes com periimplantite, o que corrobora com os estudos mencionadas á cima.

No estudo de Kuboniwa et al., 2016 foi feita a análise da predição da inflamação periodontal por meio da análise do perfil metabólico da saliva e através disso foi possível afirmar que a concentração de histidina estava aumentada nas áreas subgengivais. Encontraram 8 metabolites que foram identificados como potenciais indicadores de inflamação periodontal, dos quais a combinação de cadaverina, 5-oxoprolina e histidina apresentou acurácia satisfatória (área sob a curva = 0,881). Assim como o que foi achada através do estudo a alteração da histidina em regiões periimplantares.

O que é possível avaliar através do FTIR que a histidina é um bom biomarcador da periodontite (Simsek et al., 2016). Assim como foi demonstrado em mais dois estudos que avaliaram o câncer oral e o carcinoma escamoso oral através da avaliação dos metabólitos (Ishikawa et al., 2020; Canção et al., 2020). A histidina é um anel de imidazol que também foi encontrado nas bandas 1772, 1845, 1859 cm^{-1}, sendo marcadores importantes referentes ao estudo.

Foi observado através do PCA e dos gráficos de Box Plot que as maiores variações espectrais entre as amostras de (P) e (C) na região de *fingerprint* estão relacionadas à histidina, podendo afirmar a eficácia da histidina na proteção do tecido inflamado é atribuída à capacidade do anel imidazol de eliminar as espécies reativas de oxigênio, geradas pelas células durante a resposta inflamatória aguda. A histidina quando administrada em dose terapêutica, é capaz de inibir citosinas e fatores de crescimento envolvidos no dano celular e tecidual (Gerber et al., 1975; Hajishengalli et al., 2004).

Com relação ao modelo de estudo para diagnóstico, observou-se que a utilização de 5 componentes principais PCs foi a que melhor representou as

variações encontradas entre as amostras estudadas, com a maior precisão. Segundo o estudo de Silva de Carvalho 2011 a sua análise de elementos principais mostrou ser significativa quando analisado até 10 componentes principais o que ressalta que é fundamental a verificação dos componentes principais.

A técnica da Espectroscopia FTIR utilizando as regiões de *fingerprint* de alto número de onda possibilitou identificar em 0,81 respectivamente, a relação que existe entre as amostras de (P) e (C) através da análise dos componentes principais (PCA). Deste modo, indica que pode ser utilizada como exame complementar auxiliar do exame clínico e radiográfico.

Os heatmap são os mapas de calor, que aglomeram os espectros das amostras como (P) e (C), por exemplo, em grupos de menor para maior intensidade em respectiva banda, segundo Kuboniwa et al., 2016. De acordo com os dados do estudo apresentam dois clusters bem definidos entre os dois grupos, pode ser verificado também a relação dos dados clínicos juntamente com as bandas mais relevantes, através de uma escala de cor foi possível avaliar a intensidade de cada um dos dados e qual cluster pertence os dados.

A curva ROC mostrou um valor preditivo maior na região de altos números de onda entre 1500 e 1900 cm-1 comparando-se com a região de baixos números de onda demonstrando deste modo, apresentar maior sensibilidade e especificidade para a região de altos números de onda. Apesar de tal região espectral ser pouco estudada, é importante salientar que já foi citada em Kuboniwa et al., 2016. É possível ressaltar que os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar em futuros estudos, envolvendo as técnicas de biópsia óptica.

Já Nogueira et al., 2022 usaram esta forma de análise de dados associado ao uso de saliva como biofluído para definir se o FTIR seria uma boa ferramenta para diagnóstico de diabetes mellitus e periodontite. Obtiveram a curva ROC com valores de 0,92 a 0,95 quando considerado os grupos de diabetes e diabetes+periodontite, respectivamente. Como essa área está próxima de 1 (ou seja, classificação perfeita da amostra), segundo o que foi apresentando no estudo, com resultados próximos a 1 também, pode-se

sugerir que o FTIR pode ser potencialmente eficaz como uma ferramenta de diagnóstico.

O presente estudou mostrou que tem muito ainda a ser feito antes do uso rotineiro da biopsia óptica para diagnóstico de periimplantite, pois os estudos mais vistos na literatura relatam análise de neoplasias, segundo os autores (Cameron et al., 2016; Canção et al., 2020; Anderson et al., 2020). Em contrapartida o estudo conduzido acima reitera que o FTIR serve como uma forma de análise e diagnóstico da periimplatite com marcadores bem definidos e com relevância na prática clínica.

7.CONCLUSÃO

O FTIR fornece informação importante sobre os perfis salivares para a doença, sendo uma ferramenta eficaz na investigação da periimplantite.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkhuder K. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: a universal analytical technique with promising applications in forensic analyses. Int J Legal Med. 2022 Nov;136(6):1717-1736. doi: 10.1007/s00414-022-02882-2.

Anderson DJ, Anderson RG, Moug SJ, Baker MJ. Liquid biopsy for cancer diagnosis using vibrational spectroscopy: systematic review. BJS Open. 2020 Aug;4(4):554-562. doi: 10.1002/bjs5.50289.

Antônio Serra Aarão. Infravermelho Teória. (1ª PARTE) Análise Instrumental-8ª Aula (1ª parte) FT-IR (teória) 2020.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. J Periodontol. 2003 Dec;74(12):1736-40. doi: 10.1902/jop.2003.74.12.1736.

Baker MJ , Byrne HJ , Chalmers J , Gardner P , Goodacre R , Henderson A , Kazarian SG, Martin FL , Moger J , Stone N , Sulé-Suso J . Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play and future challenges. Analyst. 2018 Apr 16;143(8):1735-1757. doi: 10.1039/c7an01871a.

Baker MJ, Hussain SR, Lovergne L, Untereiner V, Hughes C, Lukaszewski RA, Thiéfin G, Sockalingum GD. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. Chem Soc Rev. 2016 Apr 7;45(7):1803-18. doi: 10.1039/c5cs00585j.

Bakker Schut TC, Witjes MJ, Sterenborg HJ, Speelman OC, Roodenburg JL, Marple ET, Bruining HA, Puppels GJ. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. Anal Chem. 2000 Dec 15;72(24):6010-8. doi: 10.1021/ac000780u.

Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, Uritu CM, Dodi G, Botezat D, Gardikiotis I. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical

Practice. Materials (Basel). 2019 Sep 6;12(18):2884. doi: 10.3390/ma12182884.

Bel´skaya LV, & Sarf EA. Biochemical Composition and Characteristics of Salivary FTIR spectra: Correlation Analysis. Journal of Molecular Liquids.2021: 341,117380. doi:10.1016/j.molliq.2021.117380.

Beyer-Hans KM, Sigrist MW, Silbereisen A, Ozturk VO, Emingil G, Bostanci N. Salivary Fingerprinting of Periodontal Disease by Infrared-ATR Spectroscopy. Proteomics Clin Appl. 2020 May;14(3):e1900092. doi: 10.1002/prca.201900092.

Borilova Linhartova P, Danek Z, Deissova T, Hromcik F, Lipovy B, Szaraz D, Janos J, Fassmann A, Bartova J, Drizhal I, Izakovicova Holla L. Interleukin Gene Variability and Periodontal Bacteria in Patients with Generalized Aggressive Form of Periodontitis. Int J Mol Sci. 2020 Jul 2;21(13):4728. doi: 10.3390/ijms21134728.

Brogna R, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Spectral fingerprinting to evaluate effects of storage conditions on biomolecular structure of filter-dried saliva samples and recovered DNA. Sci Rep. 2020 Dec 8;10(1):21442. doi: 10.1038/s41598-020-78306-1.

Bunaciu AA, Fleschin Ş, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Vibrational Spectroscopy in Body Fluids Analysis. Crit Rev Anal Chem. 2017 Jan 2;47(1):67-75. doi: 10.1080/10408347.2016.1209104.

Cameron JM, Butler HJ, Palmer DS, Baker MJ. Biofluid spectroscopic disease diagnostics: A review on the processes and spectral impact of drying. J Biophotonics. 2018 Apr;11(4):e201700299. doi: 10.1002/jbio.201700299.

Cameron SJ, Lewis KE, Beckmann M, Allison GG, Ghosal R, Lewis PD, Mur LA. The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum. Lung Cancer. 2016 Apr;94:88-95. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.02.006.

Canção X, Yang X, Narayanan R, Shankar V, Ethiraj S, Wang X, Duan N, Ni YH, Hu Q, Zare RN. Oral squamous cell carcinoma diagnosed from the metabolic profile of saliva. with Fourier transform. Proc.Nacional Acad. Ciência Eua. 2020: 117,16167-16173.

CARVALHO, Luis Felipe das Chagas e Silva de. Análise de queilite actínica por espectroscopia micro FT-IR. 2011. 80 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, 2011.

Chen YJ, Han Y, Mao M, Tan YQ, Leng WD, Zeng XT. Interleukin-1β rs1143634 polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med. 2015 Feb 15;8(2):2308-16.

Craveiro MO, Marvilla DF, Laurêdo LF, Mendonça L, Lemos AB, Carmo GG. Peri-implantite etiologia e tratamento. Rev Bras Odontol. 2015;72(1).

de Carvalho LFDCES , Saito Nogueira M . New insights of Raman spectroscopy for oral clinical applications. Analyst. 2018 Dec 3;143(24):6037-6048. doi: 10.1039/c8an01363b.

Derruau S, Gobinet C, Mateu A, Untereiner V, Lorimier S, Piot O. Shedding light on confounding factors likely to affect salivary infrared biosignatures. Anal Bioanal Chem. 2019 Apr;411(11):2283-2290. doi: 10.1007/s00216-019-01669-6.

Diers D, Fast JF, Götz F, Kahrs LA, Miller S, Jungheim M, Ptok M. Euclidean distances of laryngopharyngeal structures obtained from CT data for preclinical development of laryngoscopic devices. Surg Radiol Anat. 2020 Jun;42(6):695-700. doi: 10.1007/s00276-019-02397-3.

Ferreira M Jr, Saldiva PH. Computer-telephone interactive tasks: predictors of musculoskeletal disorders according to work analysis and workers' perception. Appl Ergon. 2002 Mar;33(2):147-53. doi: 10.1016/s0003-6870(01)00058-8.

Fujii S, Sato S, Fukuda K, Okinaga T, Ariyoshi W, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, Takenaka S. Diagnosis of Periodontal Disease from Saliva Samples Using Fourier Transform Infrared Microscopy Coupled with Partial Least Squares Discriminant Analysis. Anal Sci. 2016;32(2):225-31. doi: 10.2116/analsci.32.225.

Gerber DA. Low free serum histidine concentration in rheumatoid arthritis. A measure of disease activity. J Clin Invest. 1975 Jun;55(6):1164-73. doi: 10.1172/JCI108033.

Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E. Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of Porphyromonas gingivalis fimbriae with pattern-recognition receptors. Immunol Invest. 2004 May;33(2):157-72. doi: 10.1081/imm-120030917.

Hou SW, He SY, Xie J, Li MY, Hong MS, Guan FL, Hu YL, Huang YL, Xu CH. Integral characterization of normal and alopecic hair at different degeneration stages by in-situ visible and chemical imaging. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2020 Jul 5;235:118315. doi: 10.1016/j.saa.2020.118315.

Husson F, Josse J, Pages J. Principal Component Methods Hierarchial Clustering- partitional Clustering: Why Would We Need to Choose for Visualizing data. Apllied Mathematics Department.2010: 1-17.

Ishikawa S, Hiraka T, Kirii K, Sugimoto M, Schimamoto H, Sugano A, Kitabatake K,Toyogucki Y, Kanoto M, Nemoto K. Relationship between Positron Emission Tomography/Computed Tomography Standard Uptake Values and Salivary Metabolites in Oral Cancer: A Pilot Study. Journal Clin. Med. 2020: 9, 3958.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigon A, Polyzois I, Salvi GE, Schwarz F, Serino G, Tomasi C, Zitzmann NU. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16:S152-7. doi: 10.1111/jcpe.12369.

Katsani KR, Sakellari D. Saliva proteomics updates in biomedicine. J Biol Res (Thessalon). 2019 Dec 12;26:17. doi: 10.1186/s40709-019-0109-7.

Kozak M, Dabrowska-Zamojcin E, Mazurek-Mochol M, Pawlik A. Cytokines and Their Genetic Polymorphisms Related to Periodontal Disease. J Clin Med. 2020 Dec 14;9(12):4045. doi: 10.3390/jcm9124045.

Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. J Dent Res. 2016 Nov;95(12):1381-1386. doi: 10.1177/0022034516661142.

Kumar S, Srinivasan A, Nikolajeff F. Role of Infrared Spectroscopy and Imaging in Cancer Diagnosis. Curr Med Chem. 2018;25(9):1055-1072. doi: 10.2174/0929867324666170523121314.

Kuzmani H. **Solid spectroscopy: an introduction**. Springer Science & Business Media. 2009.

Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nat Rev Microbiol. 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.

Lieber CA, Mahadevan-Jansen A. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. Appl Spectrosc. 2003 Nov;57(11):1363-7. doi: 10.1366/000370203322554518.

Liebsch C, Pitchika V, Pink C, Samietz S, Kastenmüller G, Artati A, Suhre K, Adamski J, Nauck M, Völzke H, Friedrich N, Kocher T, Holtfreter B, Pietzner M.

The Saliva Metabolome in Association to Oral Health Status. J Dent Res. 2019 Jun;98(6):642-651. doi: 10.1177/0022034519842853.

Lopes J, Correia M, Martins I, Henriques AG, Delgadillo I, da Cruz E Silva O, Nunes A. FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of Biological Fluids. J Alzheimers Dis. 2016 Apr 8;52(3):801-12. doi: 10.3233/JAD-151163.

Luo L, Aubrecht J, Li D, Warner RL, Johnson KJ, Kenny J, Colangelo JL. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. PLoS One. 2018 Mar 7;13(3):e0193824. doi: 10.1371/journal.pone.0193824.

Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontol 2000. 2016 Feb;70(1):80-92. doi: 10.1111/prd.12098.

Morais CLM, Lima KMG, Singh M, Martin FL. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. Nat Protoc. 2020 Jul;15(7):2143-2162. doi: 10.1038/s41596-020-0322-8.

Movagasaghi Z, Rehman S, Rehman D. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissue. Applied Spectroscopy Reviews. 2008. 43, 134-1799. doi:10.1080/05704920701829043.

Naseer K, Ali S, Qazi J, ATR-FTIR Spectroscopy as the future of diagnostics: A systematic review of the approach using bio-fluids. Applied Spectroscopy Reviews. 2020. 56, 85-97. doi: 10.1080/05704928.2020.1738453.

Naumann D. FT- Infrared and FT-Ramn Spectroscopy in Biomedical Research. Appl. Spectrosco. Rev. 2021. 36, 239-98.

Nepomuceno G, Junho CVC, Carneiro-Ramos MS, da Silva Martinho H. Tyrosine and Tryptophan vibrational bands as markers of kidney injury: a

renocardiac syndrome induced by renal ischemia and reperfusion study. Sci Rep. 2021 Jul 22;11(1):15036. doi: 10.1038/s41598-021-93762-z.

Nogueira MS, Barreto AL, Furukawa M, Rovai ES, Bastos A, Bertoncello G, Carvalho LFDCES. FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022 Dec;40:103036. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103036.

Parachalil DR, McIntyre J, Byrne HJ. Potential of Raman spectroscopy for the analysis of plasma/serum in the liquid state: recent advances. Anal Bioanal Chem. 2020 Apr;412(9):1993-2007. doi: 10.1007/s00216-019-02349-1.

Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. Introdução a Espectroscopia, **2** edição, editora Cengage Learning, publicado 25 de novembro de 2015, capitulo 2.

Perrier L, Buja A, Mastrangelo G, Baron PS, Ducimetière F, Pauwels PJ, Rossi CR, Gilly FN, Martin A, Favier B, Farsi F, Laramas M, Baldo V, Collard O, Cellier D, Blay JY, Ray-Coquard I. Transferability of health cost evaluation across locations in oncology: cluster and principal component analysis as an explorative tool. BMC Health Serv Res. 2014 Nov 18;14:537. doi: 10.1186/s12913-014-0537-x.

Provasi C, Cassimiro-Silva PF, Ana PA.; Zezell DM, Gomes ASL, Lins EC. Estudo da espectroscopia de reflexão com radiações visíveis e infravermelhas para discriminação de tecidos pulpares humanos sadios e patológicos. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. 2016. Foz do Iguaçu - PR. Anais [...] Foz do Iguaçu – PR: CBEB, 2016.

Quinn AA, Elkins KM. The Differentiation of Menstrual from Venous Blood and Other Body Fluids on Various Substrates Using ATR FT-IR Spectroscopy. J Forensic Sci. 2017 Jan;62(1):197-204. doi: 10.1111/1556-4029.13250.

Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R. Differential Molecular

Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. Braz Dent J. 2019 Oct 7;30(5):437-445. doi: 10.1590/0103-6440201902228.

Roso-Llorach A, Violán C, Foguet-Boreu Q, Rodriguez-Blanco T, Pons-Vigués M, Pujol-Ribera E, Valderas JM. Comparative analysis of methods for identifying multimorbidity patterns: a study of 'real-world' data. BMJ Open. 2018 Mar 22;8(3):e018986. doi: 10.1136/bmjopen-2017-018986.

RStudio Team, RStudio: Integrated Development Environment for R GitHub (2020), https://github.com/rstudio/rstudio.

Singh A, Pandey B. A New Intelligent Medical Decision Support System Based on Enhanced Hierarchical Clustering and Random Decision Forest for the Classification of Alcoholic Liver Damage, Primary Hepatoma, Liver Cirrhosis, and Cholelithiasis. J Healthc Eng. 2018 Feb 1;2018:1469043. doi: 10.1155/2018/1469043.

Scarano A, Carinci F, Orsini T, Valbonetti L, Qorri E, Bignozzi CA, Lorusso F. Titanium Implants Coated with a Bifunctional Molecule with Antimicrobic Activity: A Rabbit Study. Materials (Basel). 2020 Aug 15;13(16):3613. doi: 10.3390/ma13163613.

Schwarz RA, Gao W, Redden Weber C, Kurachi C, Lee JJ, El-Naggar AK, Richards-Kortum R, Gillenwater AM. Noninvasive evaluation of oral lesions using depth-sensitive optical spectroscopy. Cancer. 2009 Apr 15;115(8):1669-79. doi: 10.1002/cncr.24177.

Sillis RH, Moore DJ, Mendelsohn R. Erythrocyte Peroxidation: Quantification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Bioquimica Anal. 1994, 218. 118-123.

Simsek Ozek N, Zeller I, Renaud DE, Gümüş P, Nizam N, Severcan F, Buduneli N, Scott DA. Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. J Dent Res. 2016 Dec;95(13):1472-1478. doi: 10.1177/0022034516663696.

Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. Br J Cancer. 2006 May 22;94(10):1460-4. doi: 10.1038/sj.bjc.6603102.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. Clin Oral Implants Res. 2008 Oct;19(10):975-82. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x.

Steffens JP, Marcantonio RA. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares. Guia Prático e Pontos-Chave. 2018.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Metabolomics. 2010 Mar;6(1):78-95. doi: 10.1007/s11306-009-0178-y.

Szymańska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. Metabolomics. 2012 Jun;8(Suppl 1):3-16. doi: 10.1007/s11306-011-0330-3.

Teodoro Nepomuceno G, Silva Neres Dos Santos R, Avance Pavese L, Parize G, Pallos D, Sorelli Carneiro-Ramos M, da Silva Martinho H. Periodontal disease in chronic kidney disease patients: salivomics by Fourier-transform infrared spectroscopy. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis. 2023 Apr 1;40(4):C93-C100. doi: 10.1364/JOSAA.482903.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Ann Periodontol. 1999 Dec;4(1):39-53. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.39.

Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2005 Oct;40(5):378-84. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00818.x.

Violet L, Mifleura A, Vanoye L, Hanhnguyend D, Favre-Reguillon A, Philippe R Fongarland G.Online Monitoring by Infrared Spectroscopy Using Multivariate Analysis- Background Theory and Application to Catalyttic Dehydrogenative Coupling of Butanol to Butyl Butyrate. React. Chem. Eng. 2019: 4, 909-918.

Xiang XM, Liu KZ, Man A, Ghiabi E, Cholakis A, Scott DA. Periodontitis-specific molecular signatures in gingival crevicular fluid. J Periodontal Res. 2010 Jun;45(3):345-52. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01243.x.

Zhang T, Wu X, Ke C, Yin M, Li Z, Fan L, Zhang W, Zhang H, Zhao F, Zhou X, Lou G, Li K. Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling. J Proteome Res. 2013 Jan 4;12(1):505-12. doi: 10.1021/pr3009572.

ZURARDI, LR. Concentrações salivares, sanguíneas e plasmáticas de Óxido Nítrico em pacientes com Doença Periodontal antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico. 2012. Tese (doutorado)- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (2012).

ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa

UnG
universidade guarulhos
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - C E P

Guarulhos, 08 de julho de 2003

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Referência.: Projeto de Pesquisa nº.205/03 - **"Avaliação dos parâmetros clínicos, microbiológicos, imunológicos e imunohistoquímicos de implantes osseointegrados"**.

Prezado Professor:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos aprovou o Projeto de Pesquisa em epígrafe sob sua coordenação e execução, na reunião ordinária realizada em 07 de julho de 2003.

Atenciosamente.

p/ Prof. Dr. Fernando Fernandes
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenador

Praça Tereza Cristina, 1 – Centro – Guarulhos – CEP 07023-070 – Tel.: (11) 6464-1700 - E-mail: ung@ung.br

Apêndice 1

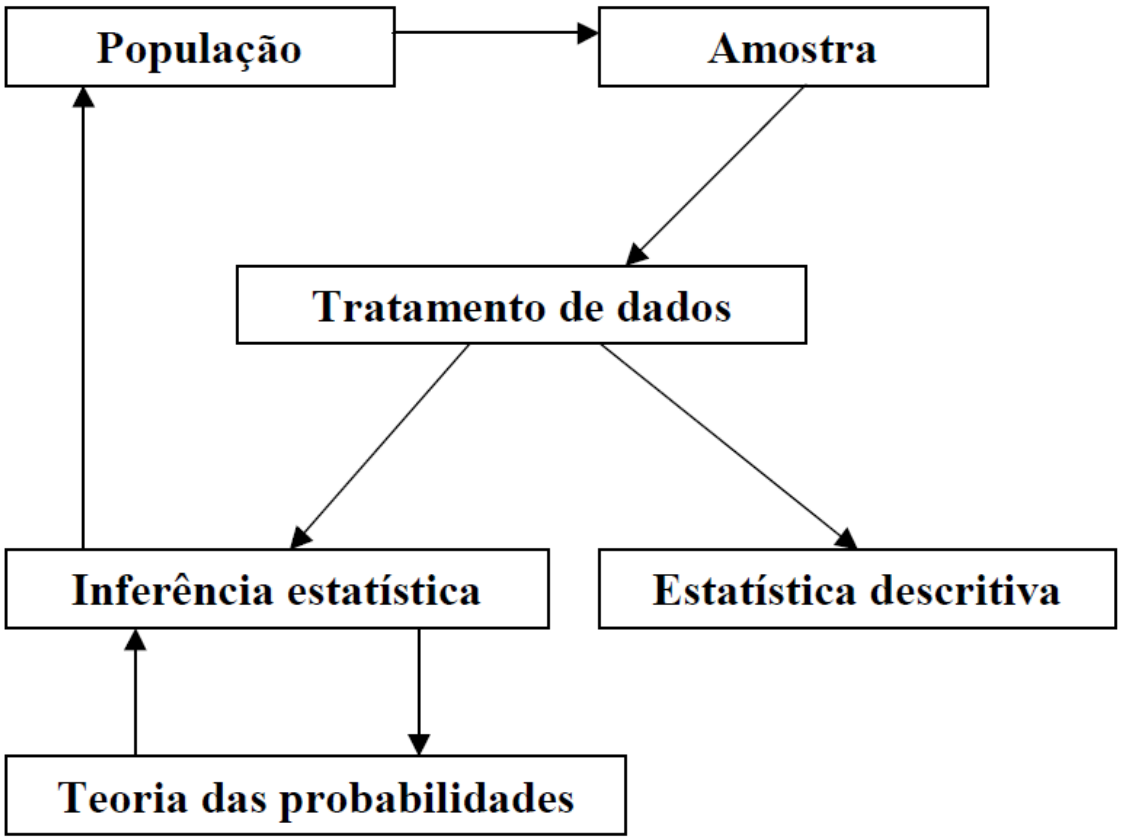
"Ciência que tem por objetivo a coleção, análise e interpretação de dados numéricos a respeito de fenômenos coletivos ou de massa, bem como a indução das leis a que tais fenômenos cabalmente obedecem e, ainda, a representação numérica e comparativa, em tabelas ou gráficos, dos resultados da análise desses fenômenos." (Michaelis).

A estatística engloba um grande leque de técnicas de análise, que podem ser divididas em duas classes gerais:

• **Estatística descritiva:** destina-se a duas finalidades principais:

• Estatística descritiva *univariada*: utilizada quando se necessita sumarizar ou descrever a distribuição de uma única variável;

• Estatística descritiva *bivariada* ("duas variáveis") ou *multivariada* ("mais de duas variáveis"): utilizada quando se necessita descrever a associação entre duas ou mais variáveis.



Fonte: Ferreira et al., 2002

Sendo assim na estatística univariada a abordagem de investigar as diferenças de tratamento entre os grupos constituiu em uma série de testes independentes de análise de variância (ANOVA) em cada variável de resultado separadamente. Para levar em consideração a natureza de medidas repetidas dos dados de entrada, também realizamos testes de efeitos mistos lineares para cada ponto final. Como não simulamos uma interação entre efeito do tratamento e tempo, incluímos apenas os efeitos principais no modelo de efeitos mistos sem um termo de interação. Rejeitamos H0 de nenhum efeito do tratamento se o efeito principal para o tratamento mento foi significativo.

A primeira estratégia multivariada que investigamos foi realizar
Testes ANOVA em escores de componentes principais (PC) obtidos a partir das variáveis originais. Usou a decomposição própria da matriz de correlação populacional para calcular os PCs, que é a abordagem preferida quando as variáveis são medidas em diferentes escalas. As pontuações dos componentes foram obtidas multiplicando os dados padronizados matriz de variáveis originais com os autovetores da matriz de correlação populaciona.

A segunda técnica multivariada consistiu em uma série de análises multivariadas de variância (MANOVA) testes em cada variável de estudo com medidas repetidas. Cada medida repetida foi considerada uma variável dependente separada para a respectiva MANOVA. A significância dos testes MANOVA foi avaliada usando quatro diferentes
estatísticas que são comumente fornecidas por software estatístico como R, SAS ou SPSS: Wilks'.Em todos os casos, H0 foi rejeitada quando o p-valor do teste foi menor que 0,05. Diferentes técnicas foram avaliadas com base na taxa de erro empírico tipo I ou no poder empírico. A taxa de erro empírico tipo I foi definido como o número de testes estatísticos significativos dividido pelo número total de testes quando nenhum efeito de tratamento foi simulado. O poder empírico foi definido como o número de testes dividido pelo número total de testes nos casos em que os efeitos do tratamento foram simulados.