

GLICOSE SALIVAR: ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS GLICO-LIPÊMICOS E QUANTIFICAÇÃO POR FT-IR EM TRABALHADORES RURAISRosileidi Pappen Umpierres¹, Hildegard Hedwig Pohl¹, Valeriano Antonio Corbellini¹**RESUMO**

Um novo método baseado em Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e quimiometria foi desenvolvido para a quantificação de glicose salivar usando amostras de saliva e sangue de 104 trabalhadores rurais de cinco municípios do Vale do Rio Pardo-RS, Brasil. O achado mais relevante do perfil glico-lipêmico foi a maior prevalência de níveis elevados de colesterol total e HDL em mulheres ($p < 0,05$). Hipertigliceridemia também foi mais prevalente em mulheres considerando apenas os valores acima do limite máximo desejável (1,0509 mmol.L⁻¹). Glicose salivar oscilou entre 0 e 0,7221 mmol.L⁻¹ e não apresentou correlação significativa com os parâmetros glico-lipêmicos avaliados. A análise de regressão via mínimos quadrados parciais entre os espectros salivares de 1ª derivada adquiridos pela técnica de reflectância especular (SRIFTS) e os respectivos valores de glicose salivar avaliados por método enzimático originaram um modelo quimiométrico com boa qualidade preditiva (RMSECV=0,0007; RMSEP = 0,0009, R²=0,999990, $p < 0,0001$). Portanto, conclui-se que a utilização de glicose salivar não se mostra como um biomarcador adequado para avaliar perfil glico-lipêmico em trabalhadores rurais. Por outro lado, pode ser estimada com facilidade por FT-IR usando método quimiométrico.

Palavras-chave: FT-IR. Saliva. Perfil Glico-lipêmico. Glicose Salivar. Quimiometria.

1 - Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul-RS, Brasil.

E-mail dos Autores:
rosileiu@unisc.br
hpohl@unisc.br
valer@unisc.br

ABSTRACT

Salivary glucose: association with glyco-lipemic parameters and FT-IR quantification in rural workers

A new method based on Fourier Transform Infrared Molecular Absorption Spectroscopy (FT-IR) and chemometrics was developed for the quantification of salivary glucose using saliva and blood samples from 104 rural workers from five municipalities of Rio Pardo Valley-RS, Brazil. The most relevant finding of the glyco-lipemic profile was the higher prevalence of elevated levels of total cholesterol and HDL in women ($p < 0.05$). Hypertriglyceridemia was also more prevalent in women considering only values above the desirable maximum limit (1.0509 mmol.L⁻¹). Salivary glucose ranged from 0 to 0.7221 mmol.L⁻¹ and showed no significant correlation with the glyco-lipemic parameters evaluated. Partial least squares regression analysis between the first derivative salivary spectra acquired by the (SRIFTS) Specular Reflect technique and the respective salivary glucose values assessed by the enzymatic method gave rise to a chemometric model with good predictive quality (RMSECV=0,0007; RMSEP = 0,0009, R²=0,999990, $p < 0.0001$). Therefore, it is concluded that the use of salivary glucose does not appear as a suitable biomarker to evaluate glyco-lipemic profile in rural workers. On the other hand, it can be easily estimated by FT-IR using a chemometric method.

Key words: FT-IR. Saliva. Glyco-lipemic Profile. Salivary Glucose. Chemometrics.

Autor correspondente:
Rosileidi Pappen Umpierres.
rosileiu@unisc.br
Fernando Abott, nº 274 sala 506.
Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
CEP: 96810-072

INTRODUÇÃO

Os índices de glicose tornam-se relevantes no diagnóstico clínico das doenças crônicas degenerativas, tendo em vista a saúde geral do indivíduo.

Os trabalhadores rurais retratam um número elevado de morbidades relacionadas a indicadores metabólicos, como glicose e lipoproteínas (Silva e colaboradores, 2008; Luz e colaboradores, 2020), requerendo ações tanto de promoção, proteção como de tratamento e recuperação de sua saúde (Moreira e colaboradores 2015).

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia (Thipsawat, 2021) atingindo a população em esfera mundial, podendo acarretar doenças oftálmicas, renais, neurológicas, bem como cardiopatias, entre outras, requerendo um constante monitoramento de seus níveis de glicose (Satish e colaboradores, 2014).

A Sociedade Brasileira de Diabetes classifica como diabético o indivíduo que possui glicemia de jejum maior ou igual ao índice de 126 mg/dL (7, 0 mmol.L⁻¹) (SBD, 2017).

O aumento progressivo do DM enfatiza a necessidade de triagens eficazes e estratégias que visem a prevenção desta enfermidade mundial (Srinivasan e colaboradores, 2015).

Diagnósticos salivares passaram a ter maior aplicabilidade no reconhecimento de sua importância ao estabelecer semelhanças expressivas entre os proteomas séricos e salivares (Srinivasan e colaboradores, 2015), fornecendo uma alternativa não invasiva à coleta de plasma e soro, podendo ser coletada rapidamente, com certa frequência e sem estresse, além de requerer um treinamento menos especializado para a coleta salivar (Papacosta, Nassis, 2011; Pappa e colaboradores, 2020).

Outras vantagens da saliva como ferramenta diagnóstica em comparação ao soro destacam alíquotas menores de amostras na coleta, boa relação custo-benefício e cooperação dos pacientes, de fácil armazenamento e correlação com os níveis sanguíneos.

A saliva é um fluido complexo que contém enzimas, proteínas, hormônios, anticorpos, citocinas e constituintes antimicrobianos (Pfaffe e colaboradores, 2011; Meleti e colaboradores, 2020), além de

carboidratos e lipídios (Boroumand e colaboradores 2021).

Os marcadores biológicos presentes no sangue estão em sua maioria também na saliva (Marti-Alamo e colaboradores, 2012) podendo assim diagnosticar e inspecionar muitas doenças orais e sistêmicas (Singh e colaboradores, 2014), como as cardiovasculares, doenças infecciosas, câncer (Al-Rawi, 2011), bacterianas, virais (Pfaffe e colaboradores, 2011), testosterona (Papacosta, Nassis, 2011), bem como para o diagnóstico e monitoramento do diabetes mellitus por intermédio do biomarcador da glicose salivar (Nunes, Mussavira, Bindhu, 2015).

A possibilidade de usar o fluido salivar para monitorar o estado saudável e as enfermidades do indivíduo é altamente desejável para o campo da pesquisa e promoção da saúde (Khaustova e colaboradores, 2010; Choudhry e colaboradores, 2022).

Demonstrando alta sensibilidade para identificar amostras biológicas a exemplo de fluidos como a saliva (Boroumand e colaboradores 2021), surge uma técnica alternativa para exames laboratoriais com a Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (Khurshid e colaboradores, 2021) bem como para a urina (Khaskheli e colaboradores, 2013; Delrue, Bruyne, Speeckaert, 2023) e o soro, entre outros (Carvalho e colaboradores, 2014; Li e colaboradores, 2023).

Scott e colaboradores (2010) descrevem que a espectroscopia de infravermelho possibilita fornecer perfis bioquímicos complexos, possibilitando apontar diversos sinais espectrais associados aos níveis de glicose por intermédio da saliva (Scott e colaboradores, 2010; Singh, Kirubha, Dhal, 2020), da mesma maneira que a detecção de drogas (Hans, Müller, Sigrüst, 2012; Brogna e colaboradores, 2020) e estresse fisiológico (Khaustova e colaboradores, 2010).

Entretanto, a literatura aponta a necessidade de pesquisas adicionais abordando a validação científica, englobando os biomarcadores específicos de diagnóstico salivar que estejam relacionados a certos distúrbios orais ou sistêmicos (Mikkonen e colaboradores, 2016).

Assim, objetiva-se avaliar a associação da glicose salivar com o perfil glico-lipêmico e quantificá-la com os espectros salivares

através de uma nova tecnologia baseada em FT-IR de um grupo de trabalhadores rurais selecionados para esse estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho se encontra integrado ao estudo "Triagem de fatores de risco relacionados ao excesso de peso em trabalhadores da agroindústria usando novas tecnologias analíticas e de informação em saúde - Fase III", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Santa Cruz do Sul-RS, Brasil sob o CAAE 78889317.1.0000.5343; estando em consonância com as Resoluções nº 466/2012 e 510/2016 da CNS.

A amostra foi composta por 104 trabalhadores rurais de cinco municípios do Vale do Rio Pardo/COREDE - Conselho Regional de Desenvolvimento do Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Os indivíduos foram selecionados por adesão voluntária e conveniência, comunicados sobre a pesquisa e posteriormente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Procedeu-se logo após com a coleta de saliva e sangue, atingindo um total de 109 indivíduos, oriundos dos municípios de Encruzilhada do Sul, Rio Pardo, Candelária, Passo do Sobrado e Vale Verde.

As coletas dos fluidos sanguíneo e salivar foram realizadas in loco nestes respectivos municípios, como também nas dependências do Laboratório de atividade Física e Saúde (LAFISA), (UNISC).

Foram excluídos do estudo 5 indivíduos que não leram e/ou não consentiram com o TCLE, pacientes que tivessem algum impedimento de fornecer saliva ou que comprometessem a integridade da saliva (ulcerações e/ou neoplasias orais), pacientes que utilizam fármacos que induzam à diminuição do fluxo salivar (xerostomia), ainda os sujeitos que apresentassem contraindicações para coleta sanguínea, além da coleta não ser recomendada em caso de lesões orais com algum sangramento, totalizando uma amostra de 104 indivíduos.

Amostragem de sangue e saliva

A amostra de saliva foi coletada em jejum por salivagem passiva em potes estéreis, até cobertura do fundo do mesmo (3-5 mL),

sendo fechado logo em seguida e armazenado em caixa de isopor refrigerado (4 a 8°C) e posteriormente congelada a -20°C.

A coleta sanguínea foi realizada após jejum de 8 horas, através de punção braquial e executada por coletador capacitado.

O sangue foi introduzido em tubos de 5 mL revestidos com silicone e incubado por 15 min a 37°C. Em seguida, foi centrifugado a 2500 rpm por 5 min; o soro foi coletado e posteriormente enviado para as análises bioquímicas.

As amostras de saliva foram descongeladas, centrifugadas a 37°C a 2500 rpm por 10 min e submetidas às análises bioquímicas e por FT-IR.

Análises bioquímicas

Glicose, colesterol total, triacilgliceróis e colesterol HDL foram quantificados por espectrofotometria via reação de Trinder, usando kits diagnósticos específicos.

O colesterol LDL foi estimado pela fórmula de Friedwald ($LDL-c = CT - HDL-c - TG/5$, sendo que o valor de TG deve ser menor de 400 mg/dL (45,2 mmol.L⁻¹) (Faludi e colaboradores, 2017).

Triplicatas de 100 µL de saliva foram misturadas com 1000 µL de reagente (glicose Liquiform ref. 133, Labtest - Minas Gerais, Brasil) e glicose quantificada pelo método da glicose-oxidase. Glicose padrão foi quantificada substituindo saliva por mistura de 90 µL de água destilada e 10 µL de padrão (100 mg.dL⁻¹).

Análises por FT-IR da saliva

Triplicatas de 30 µL de saliva foram dispostas sobre as peças de inox de 8,0 mm de diâmetro. Após desidratação em corrente de calor a 55-60°C por cerca de 10 min os filmes formados foram analisados por reflectância especular (SRIFTS) com acessório (Pike Technologies, Madison, USA) acoplado em equipamento Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer®) na faixa de 4000 – 450 cm⁻¹ com 4 pulsos de varredura, 4 cm⁻¹ de resolução.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do sistema SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), pacote de software estatístico versão 23.0.

Diferenças entre os sexos nas distribuições dos parâmetros bioquímicos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. As associações entre glicose salivar e parâmetros de perfil glico-lipêmico foram avaliadas pelo coeficiente de postos de Spearman.

Os espectros adquiridos foram convertidos em extensão *.csv, organizados em planilha Excel, normalizados pela amplitude e calculado o espectro médio de cada amostra.

O conjunto total de espectros foram submetidos à normalização pela amplitude seguida análise de regressão via mínimos quadrados parciais (PLS) para definição de pré-processamento por variável (1ª derivada, 5 pontos) e número ótimo de 2 componentes de correção de sinal ortogonal (OSC).

Ao conjunto foi aplicada validação cruzada com mútua exclusão de um por vez (LOOV) para avaliar correlação entre as variáveis latentes espectrais e o valor de glicose salivar. A otimização do modelo seguiu os passos da norma ASTM E1655-05 (ASTM, 2005).

Inicialmente foram determinados o conjunto de calibração (CC, treinamento) e o conjunto de validação externa (CP, predição ou teste). Para tanto, foi aplicada a partição sistemática 1:1 do menor ao maior valor de glicose salivar, deixando-se propositalmente os dois elementos extremos no conjunto de calibração.

A seleção do número de variáveis latentes no CC foi baseada no número mínimo necessário para alcançar um desvio padrão relativo (RSD) < 1% no CC. RSD foi determinado usando a expressão

$$\text{Eq.1} \quad \text{RSD} (\%) = \frac{100 \cdot \text{RMSECV}}{|\bar{y}|}$$

onde $|\bar{y}|$ é o valor médio das medidas de glicose salivar do CC. RMSECV é erro quadrático médio de validação cruzada e é estimado por

Eq.2

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

com n representando o número de elementos em CC, y_i o "i" ésimo valor de glicose salivar do método de referência (método enzimático) e \hat{y}_i o respectivo valor de glicose salivar predito pelo modelo PLS do CC.

Os valores do CP foram preditos adicionando um elemento por vez ao CC, reelaborando o modelo por LOOV e identificando o valor predito para o elemento em questão.

O desempenho do CP foi avaliado:

- pelos coeficiente de determinação (R^2) entre valores de referência e respectivos valores preditos;
- pelos erro quadrático médio do padrão de predição semelhante ao RMSECV, porém usando os valores de CP;
- pelos RSD substituindo RMSECV por erro quadrático médio de predição (RMSEP) e $|\bar{y}|$ pelos respectivos valores do CP.

Adicionalmente, foi avaliada a correlação dos resíduos de CC e CP com os respectivos valores de referência e, por fim, os vetores de regressão com o espectro médio total de 1ª derivada.

RESULTADOS

Dos municípios estudados pertencentes ao COREDE/Vale do Rio Pardo: 10,6% pertencem à Encruzilhada do Sul, 22,1% de Rio Pardo, 17,3% de Candelária, 19,2% de Passo do Sobrado e 30,8% são oriundos de Vale Verde. E relacionando-se com a idade da amostra populacional dessa pesquisa, obteve-se como resultado 50% para ambos os sexos.

Observamos que o índice de glicose salivar não apresentou correlação considerável com os parâmetros glico-lipêmicos analisados; já em relação à glicose sanguínea, os índices foram acima do desejável em mulheres. As médias de triglicerídeos foram de níveis aceitáveis para homens, apresentando elevados índices em mulheres.

O colesterol total (CT), o colesterol LDL e o colesterol HDL foram de valores acima do desejável tanto para homens como para mulheres. As associações entre as variáveis: a independente, glicose salivar, e as dependentes: CT, HDL, LDL, TG, bem como a glicose sanguínea e os desfechos laboratoriais foram avaliados sem distribuição normal, seguindo o coeficiente de Spearman (Tabela 1).

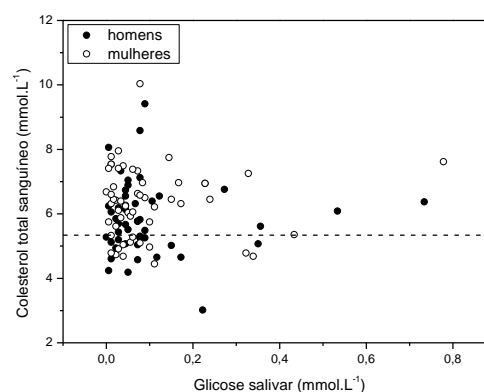
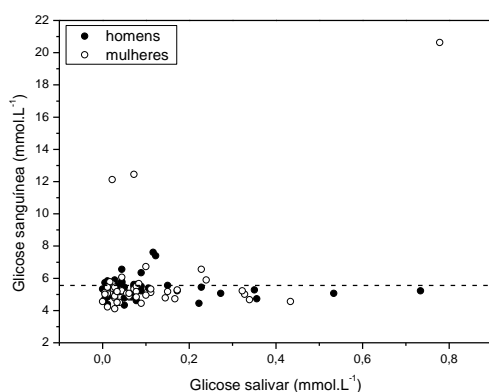
Tabela 1 - Médias e desvio padrão dos parâmetros glico-lipêmicos e glicose salivar de 104 trabalhadores rurais.

Variáveis	Masculino (n = 52) \bar{x} (DP)	Feminino (n = 52) \bar{x} (DP)	Total (n = 104) \bar{x} (DP)	ρ (p)
Idade	50,6 (12,9)	50,4 (11,4)	50,5 (12,1)	
GLI-S (mmol.L ⁻¹)	0,0993(0,0945)	0,0723(0,1056)	0,0723 (0,1008)	
GLI-B (mmol.L ⁻¹)	5,3598(0,6283)	5,7546(2,5816)	5,5600(1,8682)	0,0815(0,411)
Normal (< 5,56)	69,2%	78,8%	74,0%	
Tolerância diminuída (5,56-7,01)	26,9%	15,4%	21,2%	
Diabetes mellitus (>7,01)	3,9%	5,8%	4,8%	
TAG (mmol.L ⁻¹)	1,3583(0,4904)	1,5910(0,8656)	1,4747(0,7096)	-
Desejável (<1,695)	76,9%	75,0%	76,0%	0,0469(0,636)
Limítrofe (1,695-2,26)	19,2%	13,5%	16,3%	
Alto (2,26-5,64)	3,9%	11,5%	7,7%	
CT (mmol.L ⁻¹)	5,8344(1,1492)*	6,253(1,0868)*	6,045(1,1336)	-
Desejável (< 5,2)	28,8%	21,2%	25,0%	0,0069(0,945)
Limítrofe (5,20-6,21)	38,5%	25,0%	31,7%	
Alto (\geq 6,21)	32,7%	53,8%	43,3%	
HDL (mmol.L ⁻¹)	1,456(0,2704)*	1,6094(0,2652)*	1,5314(0,2782)	0,0582(0,557)
Baixo (<1,04)	1,9%	-	1,0%	
Intermediário (1,04-1,56)	69,2%	46,2%	57,7%	
Desejável (> 1,56)	28,9%	53,8%	41,3%	
LDL (mmol.L ⁻¹)	3,7336(1,014)	3,9135(1,0244)	3,822(1,0166)	-
Ótimo (<2,60)	9,6%	9,6%	9,6%	0,0286(0,773)
Desejável (2,60-3,35)	28,8%	21,2%	25,0%	
Limítrofe (3,35-4,13)	30,8%	30,8%	30,8%	
Alto (4,13-4,91)	19,2%	19,2%	19,2%	
Muito Alto (> 4,91)	11,6%	19,2%	15,4%	

Legenda: \bar{x} = média; DP = Desvio Padrão; GLI-S = glicose salivar; GLI-B = glicemia; TAG = triacilgliceróis; CT: colesterol total; HDL = colesterol HDL; LDL = colesterol LDL. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney); ρ = coeficiente de correlação de postos de Spearman. 1 mol.L⁻¹ de glicose = 17,99 mg.dL⁻¹; 1 mol.L⁻¹ de colesterol = 38,46 mg.dl; 1 mol.L⁻¹ de triacilglicerol = 88,5 mg.dL⁻¹.

Glicose salivar apresentou uma flutuação maior em comparação com a glicose sanguínea. A glicose salivar apresentou uma

correlação não significativa com os parâmetros do perfil glico-lipêmico (CT, HDL, LDL e TAG), (Figura 1).



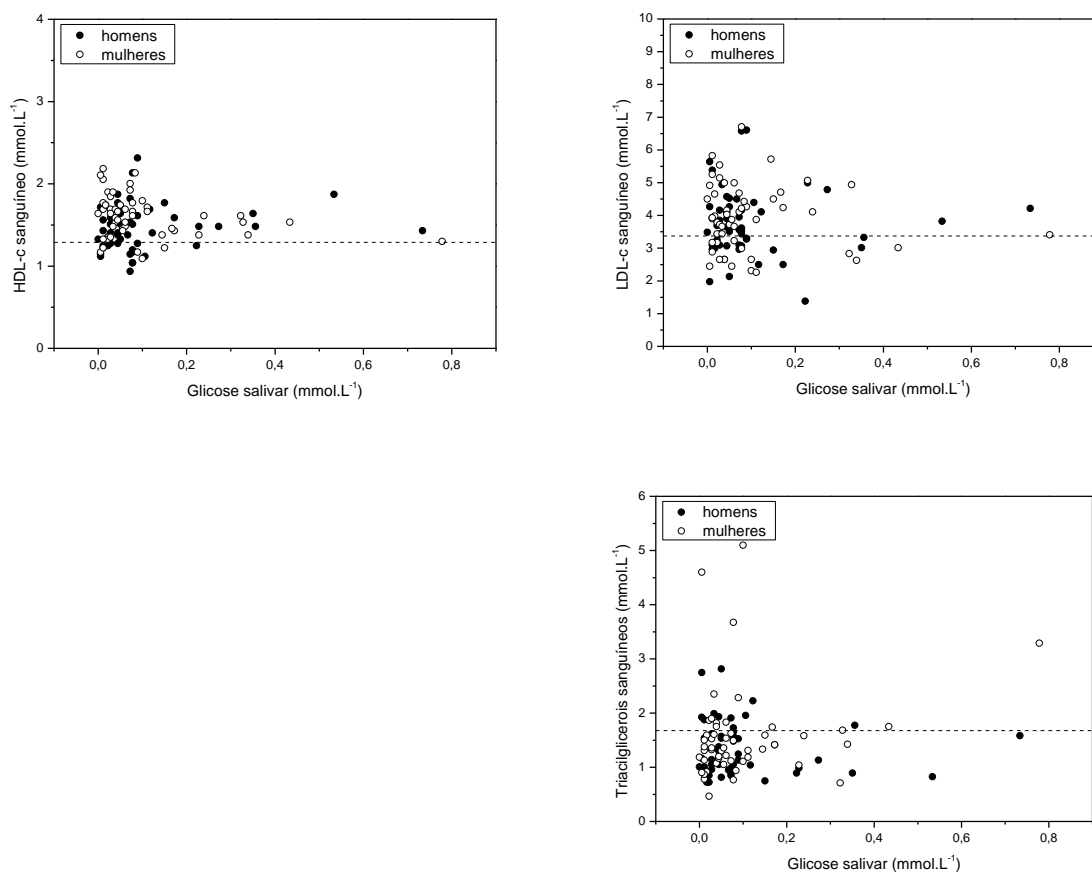


Figura 1 - Distribuição de parâmetros glico-lipêmicos de trabalhadores masculinos e femininos em função da glicose salivar. Linha pontilhada indica limite superior desejável para cada parâmetro.

Observa-se nos espectros médios por infravermelho (Figura 2), do grupo de 104 amostras a contribuição de frequências vibracionais características de componentes salivares incluindo ν O-H de grupos hidroxila de carboidratos e ácidos carboxílicos; ν N-H de proteínas; ν C=C-H de lipídios insaturados; ν C-

H de carboidratos, proteínas e lipídios; ν SC=N de tiocianato; ν C=O (Amida I) e δ N-H (amida II) de proteínas e aminoácidos; ν CO₂⁻ de carboxilato de aminoácidos; ν p=O fosfato de fosfodiésteres e ν C-O de carboidratos, ésteres e proteínas com aminoácidos hidroxilados (Caetano Júnior, Strixino, Raniero, 2015).

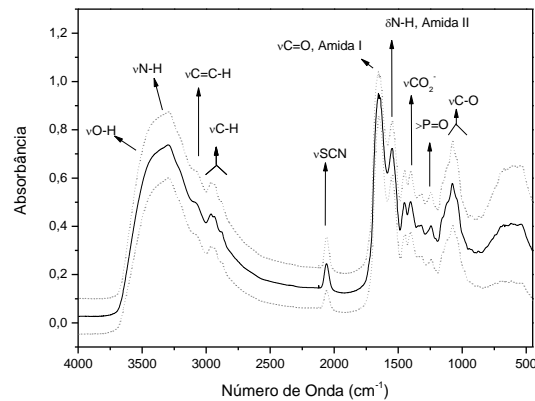


Figura 2 - Espectro médio FT-IR salivar de 104 trabalhadores rurais. Setas indicam as atribuições das principais bandas de absorção. Linhas pontilhadas representam limite inferior e superior de média \pm desvio padrão.

As duas primeiras variáveis latentes para CC e CP compactam cerca de 85% da variância original dos dados dos espectros salivares e indicam que houve homogeneidade na seleção dos elementos de CP e CC (Figura 3). VL1 separa os valores de glicose em ordem crescente (da esquerda para a direita). CP e CC apresentam pelo menos duas amostras anômalas (fora da elipse de 95%). O gráfico de correlação de resíduos com valores de

referência mostrou uma associação forte (próxima a 36%) em CC que aumentou (cerca de 46%) em CP, indicando preservação de erro sistemático na modelagem.

Porém, todos os modelos apresentaram elevada qualidade preditiva com valores de RMSECV, RMSEP menores que 0,001 mmol.L⁻¹, RSD < 1% e valores de R² maiores que 0,9999 (Tabela 2).

Tabela 2 - Figuras de mérito do modelo PLS de predição de glicose salivar por SRIFTS.

Conjunto	VL	Variância (%)	RMSECV RMSEP (mmol.L ⁻¹)	R ²	R _r	RSD (%)	Faixa de validação (mmol.L ⁻¹)
CC	3	87,36	0,0008	0,999990	-	0,78	0-0,7784
CP		87,99	0,0009	0,999991	0,5931	0,90	
					-		
					0,6769		

Legenda: CC = conjunto de calibração; CP = conjunto de predição; VL = número de variáveis latentes; RMSECV = erro quadrático médio de validação cruzada; RMSEP = erro quadrático médio de predição. R² = coeficiente de determinação de validação cruzada com mútua exclusão de 1 por vez. R_r = coeficiente de correlação de resíduos; RSD = Desvio padrão relativo.

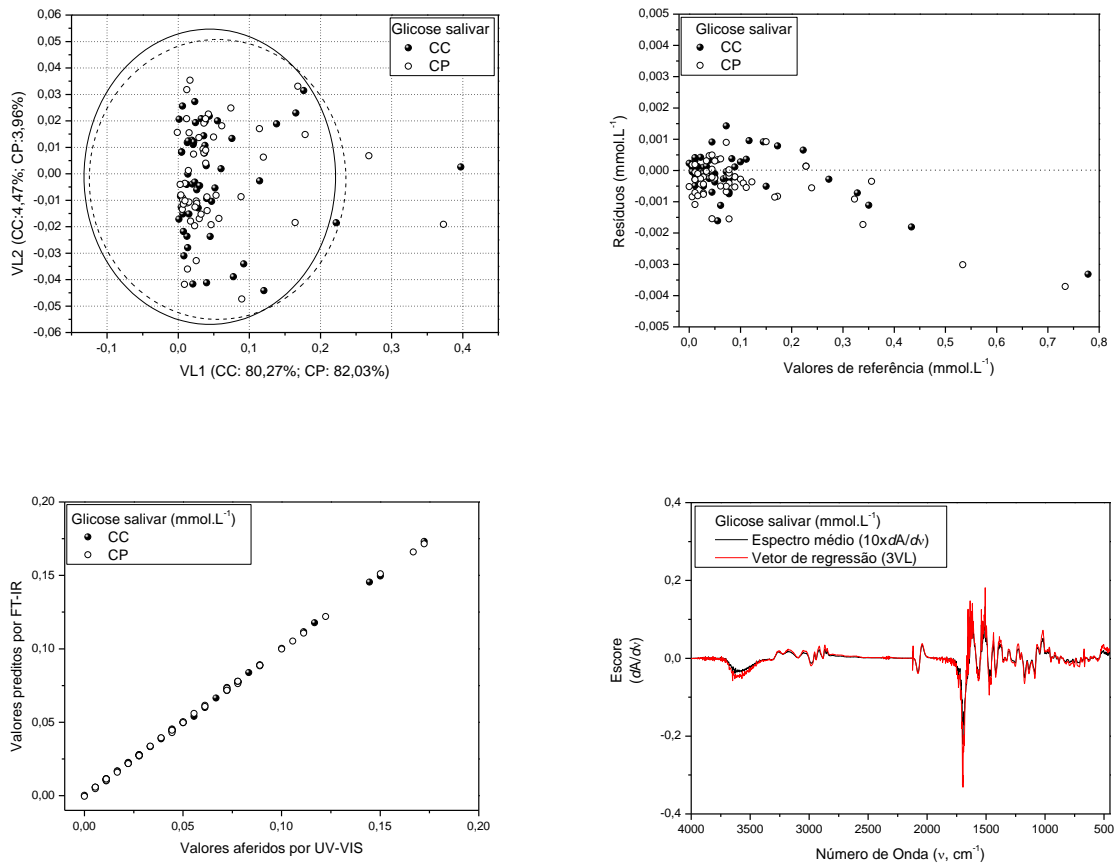


Figura 3 - Distribuição VL1xVL2 de elementos, correlação de resíduos, curva de predição e vetor de regressão para o modelo PLS Glicose salivar/SRIFTS e respectivos gráficos de predição da amostra investigada.

Poucas variações no perfil do vetor de regressão (Figura 3) foram observadas em relação ao espectro médio do conjunto de amostras, sendo mais evidentes na faixa de 2000 a 1000 cm^{-1} e com maior intensidade. No vetor de regressão podemos observar regiões de escore mais elevado, tanto positivo quanto negativo que correspondem às faixas espectrais que mais contribuem para obter os valores de correlação multivariada entre os espectros de primeira derivada e os respectivos valores da glicose salivar.

Neste caso, observam-se aumento nas contribuições nas faixas espectrais (faixa de absorção $\nu\text{C-O}$, $>\text{P=O}$) próximas à 1250 - 1000 cm^{-1} .

DISCUSSÃO

Os trabalhadores rurais integrantes desse estudo foram avaliados por indicadores de glicose e perfis lipídicos sanguíneos, apresentando alterações de glicose e TG expressivamente acima do desejável para o sexo feminino; igualmente CT, LDL e HDL indicaram valores superiores tanto para os homens quanto para as mulheres. Esses níveis exprimem um padrão característico semelhante das demais regiões rurais do Brasil, conforme mencionam Iser e colaboradores (2015) apontando altos índices de DM2 na zona rural. Os autores citam que em áreas rurais brasileiras, o diabetes pode estar falsamente diminuído em decorrência dessas regiões apresentarem menor atenção e dificuldade na

assistência médica devido à distância aos serviços de saúde.

Em concordância, Moreira e colaboradores (2015) ressaltam que trabalhadores com ocupação agrícola exibem condições inferiores tanto de saúde quanto ao estilo de vida, se comparados com trabalhadores fora do perímetro rural.

Comparativamente, tais enfermidades também podem ser encontradas em outros locais do mundo (Xhakaza e colaboradores, 2020), a exemplo de regiões rurais da Índia, conforme Kinra e colaboradores (2010) referindo-se em estudo à prevalência de dislipidemia e diabetes para o sexo masculino e hipertensão no sexo feminino, indicando um alto índice de fatores de risco para as doenças não transmissíveis.

Sendo assim, emerge a necessidade de monitoramento contínuo, bem como medidas de prevenção e controle para essas enfermidades.

As análises dos resultados obtidos por intermédio de amostras feitas com os trabalhadores rurais inclinou-se também para avaliação da associação de biomarcadores salivares de glicose correlacionando-a ao perfil glico-lipêmico (glicose, CT, HDL, LDL e TG), bem como com a espectroscopia de infravermelho por FT-IR. Esse trabalho mostrou que é possível quantificar glicose salivar por infravermelho, porém não se tornou plausível correlacionar esse parâmetro com o perfil glico-lipêmico.

Em amostra de um grupo de 40 diabéticos e 40 não diabéticos, sendo a estimativa quantitativa dos níveis de glicose no sangue e saliva realizada pelo método da glicose oxidase, utilizando o kit enzimático glicose oxidase peroxidase, e resultando num coeficiente de correlação para os não diabéticos de + 0,58 e + 0,40 para os diabéticos, comprovando a correlação entre os valores de glicose de jejum e glicemia de jejum (Agrawal e colaboradores 2013).

Em outro estudo para determinar a correlação entre as concentrações entre a glicose salivar e sanguínea em indivíduos saudáveis não diabéticos e pacientes com diabetes mellitus, uma correlação significativa ($r=0,54$) e ($r=0,45$) foi encontrada entre glicemia de jejum e glicose salivar em jejum para grupo diabético e grupo controle, respectivamente, sugerindo que a saliva pode ser utilizada na avaliação da concentração da glicose

sanguínea em pacientes com diabetes (Satish e colaboradores, 2014).

Equitativamente Kadashetti e colaboradores (2015), apontam níveis de glicose salivar em correlação significativa da população em seu estudo, sugerindo que os níveis de glicose salivar podem ser usados como uma ferramenta de monitoramento para prever o nível de glicose em pacientes diabéticos.

Entretanto, na literatura encontramos uma controvérsia sobre a relação entre a concentração de glicose plasmática e glicose salivar. Vários autores consideram que um aumento na concentração de glicose na saliva corresponde com a glicemia, porém essa relação não é confirmada (Cui e colaboradores, 2022).

Um estudo incluindo oitenta e oito adultos diabéticos e trinta e nove adultos não diabéticos (controle), sendo a glicose avaliada por um método colorimétrico, e como resultado não identificado uma correlação positiva entre os níveis de glicose do sangue e da saliva, em ambos os grupos (Lima-Aragão e colaboradores, 2016).

Em outra pesquisa indiana conduzida para avaliar a correlação entre glicose sanguínea e glicose salivar em pacientes diabéticos e grupo controle totalizando 250 pacientes, dos quais 212 formaram o grupo de estudo e 38 faziam parte do grupo controle, concluindo que os valores de glicose salivar não podem ser considerados como ferramenta diagnóstica para indivíduos diabéticos.

A despeito disso, Mabel, Abhinaya (2018), relatam em estudo que participaram 70 indivíduos diabéticos sendo o grupo de estudo, e 70 indivíduos saudáveis como grupo controle, relacionando a glicose salivar com a glicose sanguínea.

Como resultado, o parâmetro da glicose salivar foi considerada insignificante quando comparado entre os grupos diabético e não-diabético.

Tais resultados contraditórios emergem para a necessidade de continuar utilizando a glicose salivar para o diagnóstico clínico.

Em face disso, propomos a utilização da espectroscopia de infravermelho por ser um método com facilidade de técnica e instrumentação acessível, de forma a adquirir espectros de amostras de maneira rápida, não invasiva, livre de reagentes e reduzindo assim o seu custo.

A utilidade da saliva como potencial em ensaios clínicos direcionou muitos grupos à pesquisa; no entanto, a ciência literária referiu-se em poucos estudos que analisaram saliva por FT-IR, e dos pesquisados, resultados promissores foram encontrados com análise quantitativa em relação a seus componentes bioquímicos (Perez-Guaita e colaboradores, 2012; Nogueira e colaboradores, 2022).

Foi possível verificar que a análise por FT-IR aliada à técnica de PLS pode ser uma ferramenta utilizada no diagnóstico e monitoramento do índice glicêmico dos trabalhadores rurais avaliados neste estudo, assim como observamos com dados de pesquisa com a mesma característica, em que Scott e colaboradores (2010) apontam 39 indivíduos diagnosticados com diabetes, e 22 participando do grupo controle sem diabetes, e após obtida a amostra de saliva, a análise espectral revelou diferenças em vários dos principais componentes metabólicos - lipídios, proteínas, glicose, tiocianato e carboxilato - que identificam claramente a saliva saudável e doente.

A precisão para o diagnóstico de diabetes com base na espectroscopia de infravermelho foi de 100% no conjunto de treinamento (calibração) e 88,2% no conjunto de validação (predição), estabelecendo que a espectroscopia de infravermelho pode ser usada para gerar perfis bioquímicos complexos na saliva e identificar várias características espectrais associadas ao diabetes.

Em decorrência a valores de glicose salivar apresentarem-se inferiores à sua concentração plasmática expostos neste estudo, a literatura expõe uma alternativa precisa que torna a FT-IR como uma possibilidade de facilitar e gerenciar o diagnóstico dos índices glico-lipêmicos, pois apresenta uma forte correlação associando a glicose salivar aos valores espectrais pelo infravermelho, tornando-o ideal para o uso em atenção primária, delineando os desfechos até agora vistos, em maiores populações.

Em nosso estudo optamos em seguir com a metodologia descrita por autores que incluem a etapa do congelamento das amostras de saliva tão logo tenham sido coletadas até o seu processamento, em razão das amostras não terem sido imediatamente procedidas com suas análises.

Posteriormente foram centrifugadas, intencionando limpar componentes que poderiam estar interferindo na interpretação do

fluido salivar, tornando-a mais límpida (Caetano-Júnior, Strixino, Raniero, 2015).

Outro motivo a não as realizar logo após suas coletas justifica-se ao fato das mesmas terem sido coletadas em localidades distintas, permitindo atender um maior número de sujeitos e transportar com segurança as amostras coletadas até o laboratório de análises, tornando possível suas estimativas com os equipamentos adequados.

CONCLUSÃO

Embora estudos sugiram algum potencial para a saliva como um marcador para o diagnóstico e monitoramento de doenças tanto orais como sistêmicas, incluindo nestas o diabetes mellitus, a glicose salivar avaliada do ponto de vista enzimático ainda necessita de mais pesquisas para explorar as implicações clínicas dos resultados deste estudo com trabalhadores rurais, em função de apresentar uma baixa correlação relacionando glicose salivar aos perfis glico-lipêmicos.

Dessa forma, a glicose salivar não tem potencial para monitorar diabetes e dislipidemia. Novos estudos com maior tamanho de amostra precisam ser realizados para estabelecer glicose salivar um marcador de diabetes.

A análise diagnóstica da glicose salivar relacionando os valores de referência aos valores preditos por FT-IR indicou um valor preditivo positivo.

Apesar de não se ter encontrado uma correlação entre a glicose salivar e os parâmetros glico-lipêmicos, encontramos uma excelente associação entre os espectros da saliva e o valor da glicose salivar.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO

Não houve conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- 1-Agrawal, R.P.; Sharma, N.; Rathore, M.S.; Gupta, V.B.; Jain, S.; Agarwal, V.; Goyal, S. Noninvasive method for glucose level estimation by saliva. *Journal of Diabetes and Metabolism*. Vol. 4. 2013. p. 1-5.
- 2-Al-Rawi, N.H. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diabetes & Vascular Disease Research*. Vol. 8. 2011. p. 22-28.

- 3-ASTM. Annual Book of ASTM Standards, Standards Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis, ASTM International E1655-05. West Conshohocken. 2005.
- 4-Boroumand, M.; Olianas, A.; Cabras, T.; Manconi, B.; Fanni, D.; Faa, G.; Desiderio, C.; Messana, I.; Castagnola, M. Saliva, a bodily fluid with recognized and potential diagnostic applications. *Journal of Separation Science*. Vol. 44. Num. 19. 2021. p. 3677-3690.
- 5-Brogna, R.; Oldenhof, H.; Sieme, H.; Wolkers, W.F. Spectral fingerprinting to evaluate effects of storage conditions on biomolecular structure of filter-dried saliva samples and recovered DNA. *Scientific Reports*. Vol. 10. Num. 1. 2020. p. 1-12.
- 6-Caetano Júnior, P.C.; Strixino, J.F.; Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering*. Vol. 31. 2015. p. 116-124.
- 7-Carvalho, C.S.; Andrade, L.E.C.; Keusseyan, S.P.; Rangel, J.L.; Strixino, J.F.; Martin, A.A.; Raniero, L.J. Study of advanced rheumatoid arthritis. *Brazilian Journal of Biomedical Engineering*. Vol. 30. 2014. p. 54-63.
- 8-Choudhry, A.A.; Kumar, P.; Prasad, M.; Mohapatra, T.; Sharma, P. Validation of salivary glucose as a screening tool of diabetes mellitus. *Romanian Journal of Internal Medicine*. Vol. 60. Num. 3. 2022. p. 145-152.
- 9-Cui, Y.; Zhang, H.; Zhu, J.; Lião, Z.; Wang, S.; Liu, W. Correlations of Salivary and Blood Glucose Levels among Six Saliva Collection Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 19. 2022. p. 4122.
- 10-Delrue, C.; Bruyne, S.; Speeckaert, M.M. Unlocking the Diagnostic Potential of Saliva: A Comprehensive Review of Infrared Spectroscopy and Its Applications in Salivary Analysis. *Journal of Personalized Medicine*. Vol. 13. Num. 6. 2023. p. 907.
- 11-Faludi, A.A.; Izar, M.C.O.; Saraiva, J.F.K.; Chacra, A.P.M.; Bianco, H.T.; Afiune Neto, A. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Vol. 109. 2017. p. 1-76.
- 12-Hans, K.M.; Müller, S.; Sigrist, M.W. Infrared attenuated total reflection (IR-ATR) spectroscopy for detecting drugs in human saliva. *Drug Testing and Analysis*. Vol. 4. 2012. p. 420-429.
- 13-Iser, B.P.M.; Stopa, S.R.; Chueiri, P.S.; Szwarcwald, C.L.; Malta, D.C.; Monteiro, H.O.C.; Duncan, B.B.; Schmidt, M.I. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Vol. 24. 2015. p. 305-314.
- 14-Kadashetti, V.; Baad, R.; Malik, N.; Shivakumar, K.M.; Vibhute, N.; Belgaumi, U.; Gugawad, S.; Pramod, R.C. Glucose level estimation in Diabetes Mellitus by saliva: a bloodless revolution. *Romanian Journal of Internal Medicine*. Vol. 53. Num. 3. 2015. p. 248-252.
- 15-Khaskheli, A.R.; Sherazi, S.T.; Mahesar, S.A.; Kandhro, A.A.; Kalwar, N.H.; Mallah, M.A. Estimation of ibuprofen in urine and tablet formulations by transmission Fourier Transform infrared spectroscopy by partial least square. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Vol. 7. 2013. p. 403-407.
- 16-Khaustova, S.; Shkurnikov, M.; Tonevitsky, E.; Artyushenko, V.; Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst*. Vol. 135. 2010. p. 3183-3192.
- 17-Khurshid, Z.; Warsi, I.; Moin, S.F.; Slowey, P.D.; Latif, M.; Zohaib, S.; Zafar, M.S. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. 100. 2021. p. 205-253.
- 18-Kinra, S.; Bowen, L.J.; Lyngdoh, T.; Prabhakaran, D.; Reddy, K.S.; Ramakrishnan, L.; Gupta, R.; Bharathi, A.V.; Vaz, M.; Kurpad, A.V.; Smith, G.D.; Ben-Shlomo, Y.; Ebrahim, S. Sociodemographic patterning of non-communicable disease risk factors in rural India: a cross sectional study. *BMJ*. Vol. 1. 2010. p. 1-9.

- 19-Li, L.; Wu, J.; Yang, L.; Wang, H.; Xu, Y.; Shen, K. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: An Innovative Method for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Cancer Management and Research*. Vol. 13. 2023. p. 2389-2399.
- 20-Lima-Aragão, M.V.V.; Oliveira-Junior, J.J.; Maciel, M.C.G.; Silva, L.A.; Nascimento, F.R.F.; Guerra, R.N.M. Salivary profile in diabetic patients: biochemical and immunological evaluation. *BMC Research Notes*. Vol. 9. 2016. p. 103.
- 21-Luz, T.C.; Cattafesta, M.; Petarli, G.B.; Meneguetti, J. P.; Zandonadi, E.; Bezerra, O.M.P.A.; Salaroli, L.B. Fatores de risco cardiovascular em uma população rural brasileira. *Ciência & Saúde Coletiva*. Vol. 25. 2020. p. 3921-3932.
- 22-Mabel, R.C.; Abhinaya, L.M. Noninvasive estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary protein and salivary PH in diabetic and non-diabetic patients - a case control study. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 5. Num 5. 2018. p. 587-592.
- 23-Marti-Alamo, S.; Mancheno-Franch, A.; Marzal-Gamarra, C.; Carlos-Fauel, L. Saliva as a diagnostic fluid, Literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. Vol. 4. 2012. p. 237-43.
- 24-Meleti, M.; Cassi, D.; Vescovi, P.; Setti, G.; Pertinhez, T.A.; Pezzi, M.E. Salivary biomarkers for diagnosis of systemic diseases and malignant tumors. A systematic review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. Valencia. Vol. 25. Num. 2. 2020. p. e299-e310.
- 25-Mikkonen, J.J.W.; Raittila, J.; Rieppo, L.; Lappalainen, R.; Kullaa, A.M.; Myllymaa, S. Fourier transform infrared spectroscopy and photoacoustic spectroscopy for saliva analysis. *Applied Spectroscopy*. Vol. 70. 2016. p. 1502-1510.
- 26-Moreira, J.P.L.; Oliveira, B.L.C.A.; Muzi, C.D.; Cunha, C.L.F.; Brito, A.S.; Luiz, R.R. A saúde dos trabalhadores da atividade rural no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. Vol. 31. 2015. p. 1698-1708.
- 27-Nogueira, M.S.; Barreto, A.L.; Furukawa, M.; Rovai, E.S.; Bastos, A.; Bertocello, G.; Carvalho, L.F.C.S. FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Vol. 40. 2022. p. 103036.
- 28-Nunes, L.A.; Mussavira, S.; Bindhu, O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica*. Vol. 25. 2015. p. 177-92.
- 29-Papacosta, E.; Nassis, G.P. Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *Journal of Science and Medicine in Sport*. Vol. 14. 2011. p. 424-434.
- 30-Pappa, E.; Vougas, K.; Zoidakis, J.; Vastardis, H. Proteomic advances in salivary diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins Proteomics*. Vol. 1868. Num. 11. 2020. 140494.
- 31-Perez-Guaita, D.; Ventura-Gayete, J.; Pérez-Rambla, C.; Sancho-Andreu, M.; Garrigues, S.; Guardia, M. Protein determination in serum and whole blood by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 404. 2012. p. 649-56.
- 32-Pfaffe, T.; Cooper-White, J.; Beyerlein, P.; Kostner, K.; Punyadeera, C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical Chemistry*. Vol. 57. 2011. p. 675-687.
- 33-Satish, B.N.V.S.; Srikala, P.; Maharudrappa, B.; Awanti, S.M.; Kumar, P.; Saliva, D.H. A tool in assessing glucose levels in Diabetes Mellitus. *Journal of International Oral Health*. Vol. 6. 2014. p. 114-117.
- 34-Scott, D.A.; Renaud, D.E.; Krishnasamy, S.; Meric, P.; Buduneli, N.; Cetinkalp, S.; Liu, K.Z. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva, Diabetology & Metabolic Syndrome. Vol. 2. 2010. p. 48.
- 35-Silva, D.A.; Felisbino-Mendes, M.S.; Pimenta, A.M.; Gazzinelli, A.; Kac, G.; Velásquez-Meléndez, G. Distúrbios metabólicos e adiposidade em uma população

rural. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. Vol. 52. 2008. p. 489-498.

36-Singh, S.; Ramesh, V.; Oza, N.; Balamurali, P.D.; Prashad, K.V.; Balakrishnan, P. Evaluation of serum and salivary lipid profile: a correlative study. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. Vol. 18. 2014. p. 4-8.

37-Singh, T.; Kirubha, S.P.A.; Dhal, S. Spectroscopic Study of Human Saliva Sample by ATR-FTIR Spectroscopy for Detection of Diabetes Mellitus. Journal of University of Shanghai for Science and Technology. Vol. 22. 2020. p. 104-112.

38-SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2 - Algoritmo SBD. Posicionamento Oficial SBD nº 02/2017. São Paulo. 2017.

39-Srinivasan, M.; Blackburn, C.; Mohamed, M.; Sivagami, A.V.; Blum, J. Literature-based discovery of salivary biomarkers for type 2 Diabetes Mellitus. Biomarker Insights. Vol. 10. 2015. p. 39-45.

40-Thipsawat, S. Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature. Diabetes and Vascular Disease Research. Vol. 18. Num. 6. 2021.

41-Xhakaza, L.; Abrahams-October, Z.; Mohammednur, M.M.; Pearce, B.; Adeniyi, O.V.; Johnson, R.; Benjeddou, M. Socio-demographic and modifiable risk factors of diabetes and hypertension among resource constrained patients from rural areas in Mdantsane Township in South Africa. African Health Sciences. Vol. 20. Num. 3. 2020. p. 1344-1354.

Recebido para publicação em 12/07/2023
Aceito em 14/10/2023