

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ALGORÍTIMO PARA DETECÇÃO DE INSULINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS
BASEADO EM COMPONENTES SALIVARES DETECTADOS POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA FTIR PARA UTILIZAÇÃO COMO PLATAFORMA
DIAGNÓSTICA**

POLIANA PEREIRA CARVALHO

UBERLÂNDIA
2018

POLIANA PEREIRA CARVALHO

**ALGORÍTIMO PARA DETECÇÃO DE INSULINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS
BASEADO EM COMPONENTES SALIVARES DETECTADOS POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA FTIR PARA UTILIZAÇÃO COMO PLATAFORMA
DIAGNÓSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo César Fernandes Júnior

UBERLÂNDIA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C331a
2018 Carvalho, Poliana Pereira, 1984-
Algoritmo para detecção de insulina em fluidos biológicos baseado em componentes salivares detectados por meio de espectroscopia FTIR para utilização como plataforma diagnóstica [recurso eletrônico] / Poliana Pereira Carvalho. - 2018.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Coorientador: Paulo César Fernandes Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.802>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Diabetes. 3. Saliva. 4. Insulina. I. Silva, Robinson Sabino da, (Orient.). II. Fernandes Júnior, Paulo César, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FOLHA DE APROVAÇÃO

Poliana Pereira Carvalho

ALGORÍTIMO PARA DETECÇÃO DE INSULINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS BASEADO EM COMPONENTES SALIVARES DETECTADOS POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FTIR PARA UTILIZAÇÃO COMO PLATAFORMA DIAGNÓSTICA

Presidente da banca (orientador): Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Titular: Profa. Dra. Luciana Machado Bastos

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Titular: Prof. Dra. Roberta Rezende Rosa

Instituição: Centro Universitário do Triângulo - UNITRI

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Paulo Guilherme, pelo amor, carinho, companheirismo renovados a cada dia de nossa união e pela compreensão nas horas em que estive ausente.

Aos meus queridos pais, Paulo e Elma, responsáveis pela formação do meu caráter, pelas orientações constantes, amor incondicional, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus benevolente.

Todas as palavras seriam insuficientes para expressar a minha eterna gratidão por este êxito, obrigada meu Deus!

A minha querida madrinha, Maria de Lourdes, pelo constante exemplo de amor e incentivo.

Ao Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva, meu orientador, não apenas pela orientação segura e paciente durante a elaboração deste trabalho, mas também pela confiança em mim depositada, oportunidade de experiência, convívio e enriquecimento do meu saber.

Aos professores do curso, em especial ao Dr. Paulo César Fernandes Júnior, pela experiência de vida transmitida.

À companheira de trabalho Léia Cardoso de Sousa pelo aprendizado e ajuda para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus familiares, em especial a minha irmã Maristela, pela força, pelo carinho e estímulos sempre presentes.

Aos meus amigos, que souberam entender os períodos que estive distante, mas nunca ausente do nosso convívio.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

“O sorriso traduz geralmente o estado da alma,
desvendando delicadamente o interior de quem sorri.”

Mário Quintana

RESUMO

Introdução: Atualmente a mensuração de insulina no diabetes é realizada por procedimento invasivo, doloroso e de alto custo. Conseqüentemente a busca por um método de mensuração de insulina mais barato (sem utilização de reagentes), não-invasivo e indolor é de grande interesse. **Objetivo:** Esta pesquisa buscou identificar modos vibracionais da saliva detectados por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) associada a um sistema de reflexão total atenuada (ATR) para ser utilizado na detecção da insulina em fluídos biológicos. **Materiais e métodos:** Para a análise de ATR-FTIR utilizou-se 2 μL de cada amostra com diferentes concentrações de insulina ($0 \text{ U}/\mu\text{L}$; $1,5 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $6,25 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $50 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ e $100 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$) que foram colocadas sobre o cristal ATR e secas com ar comprimido durante 3 min. As análises de FTIR foram realizadas em duplicata para garantir a confiabilidade do teste. A profundidade de penetração da película de insulina variou entre 0,1 e 2 μm e dependeu do comprimento de onda, ângulo de incidência do feixe e do índice de refração do material de cristal ATR. Foi construído um algoritmo capaz de quantificar a concentração de insulina em fluidos biológicos detectados por espectroscopia. Utilizou-se a correlação de Pearson como análise estatística da comparação entre as concentrações conhecidas de insulina com a aplicação da mensuração de insulina por ATR-FTIR após a aplicação do algoritmo. **Resultados:** Foi desenvolvido um algoritmo baseado (i) na área do espectro original entre $1620,9 \text{ cm}^{-1}$ e $1720,7 \text{ cm}^{-1}$ e (ii) no vetor de intensidade do modo vibracional do espectro salivar em 1542 cm^{-1} . **Conclusão:** Considerando que não existe descrição dessa metodologia em outros estudos e não existe esse método por FTIR, concluiu-se que este algoritmo tem potencial para ser utilizado como ferramenta complementar para mensuração rápida, indolor e não-invasiva da insulina em fluídos biológicos como a saliva, urina e líquido.

Palavras chave: Diabetes, saliva, ATR-FTIR, biomarcador e diagnóstico

ABSTRACT

Introduction: Currently the insulin measurements is performed by invasive procedure, painful and costly. Consequently, the search for a cheaper method of measuring insulin (without the use of reagents), non-invasive and painless is of great interest. **Objective:** This study aim to identify vibrational modes detected by infrared spectroscopy with Fourier transform of attenuated total reflection (ATR-FTIR) of saliva to be used in the insulin detection in biological fluids. **Materials and Methods:** It was used an algorithm able to quantify the concentration of insulin in biological fluids detected by spectroscopy. We used 2 μL of each sample with insulin in different concentrations ($0 \text{ U}/\mu\text{L}$; $1.5 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $6.25 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $50 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ and $100 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$) that were placed on the ATR crystal and dry with compressed air during 3 min. The penetration depth of the sample ranged between 0.1 and 2 μm and depended on the wavelength, angle of incidence of the beam and the index of refraction of the ATR crystal material. It was used the Pearson correlation with statistical analysis of the comparison between the known concentrations of insulin with the application of measurement of insulin by FTIR after the implementation of the algorithm. **Results:** It was found that there was the development of the algorithm with the use of the average spectrum of artificial saliva without insulin, of artificial saliva with growing solutions of insulin and insulin breeding in the spectrum between $1750\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$. **Conclusion:** Whereas there is no description of this methodology in other studies and there is not this method by FTIR, it was concluded that this algorithm has the potential to be used as a complementary tool for fast, painless and non-invasive measurement insulin in biological fluids such as saliva, urine and cerebrospinal fluid.

Key words: Diabetes, saliva, ATR-FTIR, biomarker and diagnostic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. ANEXO.....	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia que resulta da insuficiente secreção e/ou redução da ação da insulina em tecidos periféricos. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF) há uma estimativa de 415 milhões de adultos com diagnóstico de diabetes em todo o mundo, no entanto há uma estimativa de mais 193 milhões de pacientes potencialmente com DM e sem o devido diagnóstico. O DM apresenta um grande impacto social, pois pode acometer indivíduos durante a juventude e a prolongada exposição à hiperglicemia antecipa o desenvolvimento das complicações crônicas. A hiperglicemia crônica promove alterações microcirculatórias, retinopatias, nefropatias e neuropatias periféricas. Adicionalmente, podem ocorrer desequilíbrios na cicatrização e no desenvolvimento de complicações agudas que podem levar a risco de vida como a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica (Skyler et al., 2017).

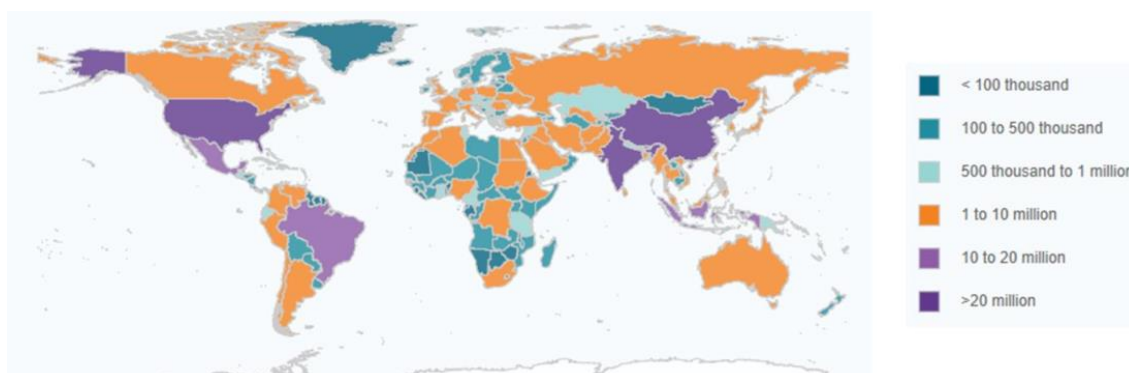


Figura 1: Prevalência de diabetes mellitus (IDF, 2015).

Uma característica do quadro clínico de DM, que é uma doença auto-imune, é a função e/ou secreção de insulina diminuída com reduzido controle glicêmico. O Diabetes tem sido classificado em dois tipos: Diabetes Mellitus

Tipo 1 (DM1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Chopra, 2012). O DM1 é classificado como uma doença autoimune que resulta de uma combinação de susceptibilidade genética, desregulação imunológica e exposição a causas ambientais (como, por exemplo, infecções virais), que levam à morte das células beta e consequente deficiência na produção de insulina. O DM2 tem uma patogênese complexa que tem sido extensivamente estudada. Está estabelecido que o sedentarismo e a obesidade são os principais fatores que contribuem para o desencadeamento da doença, embora possa haver fatores genéticos de predisposição e ambientais que contribuem para estimular o aparecimento da doença (Maschio, 2014).

Os critérios atuais para diagnóstico de DM são: glicemia maior que 200 mg/dL associada aos sintomas clássicos de diabetes (perda de peso, poliúria e polidipsia); glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL; teste de tolerância oral à glicose com glicemia de 2 horas após receber 75g de glicose maior ou igual a 200 mg/dL e teste de hemoglobina glicada (HbA1c) com valores maiores ou igual a 6,5% (ADA, 2017). Em humanos, a insulina é produzida pelas células β que estão localizadas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas. Aproximadamente 80% das células das ilhotas são compostas de células β , e redução ou ausência de função destas células em indivíduos com diabetes leva a baixa ou uma completa falta de secreção de insulina (Chopra, 2012). Assim, tem havido um grande interesse na determinação das vias envolvidas no aumento das células beta pancreáticas e a aplicação deste conhecimento em terapias moleculares e celulares do diabetes. Em especial, a via de sinalização da Wnt/beta-catenina (ou via Wnt canônica) tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Várias mutações na via Wnt (família de glicolipoproteína)

estão invariavelmente ligadas a defeitos congênitos humanos e detecção precoce no tumor de pâncreas. Assim, em determinados órgãos, é sabido que a proteína beta-catenina constitui não somente um componente estrutural das junções de adesão, mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com a Wnt, participando de vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação. Hiperplasia da célula beta-pancreática parece ocorrer em certas condições experimentais e *in vivo*, como no estado de resistência periférica à insulina. Entretanto, as vias intracelulares envolvidas nesse processo ainda permanecem desconhecidas (Maschio, 2014).

O câncer de pâncreas é o segundo mais freqüente de malignidade gastrointestinal. No geral, é a quarta causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer, refletindo o seu avançado estágio de apresentação. A detecção precoce de câncer pancreático oferece a promessa de melhoria das taxas de mortalidade após a ressecção cirúrgica. Um obstáculo significativo para a detecção precoce do câncer de pâncreas é o desenvolvimento de métodos que eficientemente possam identificar os indivíduos potencialmente afetados. Existem estratégias atuais para detecção precoce de câncer pancreático; no entanto, elas estão confinadas a um pequeno número de pacientes de maior risco, muitas vezes contando com procedimentos invasivos, ou falta-lhes a necessária sensibilidade e especificidade para fazer o seu rastreio generalizado e aplicável. A busca de biomarcadores úteis em potencial do câncer pancreático é ainda mais complicada pela existência de várias doenças pancreáticas benignas como a pancreatite crônica, que tem sobreposição fenotípica com início de câncer pancreático. A falta de

biomarcadores de câncer de pâncreas altamente específicos é muitas vezes devido à sua presença em pacientes com pancreatite crônica (Hu et al., 2008).

Como um espelho do corpo, a saliva é facilmente acessível e não invasiva. Os componentes salivares, incluindo DNA, RNA, proteínas e bactérias têm sido amplamente ligados a ciências forenses, doença bucal, e doença sistêmica. Assim, uma abordagem de detecção de alta especificidade para identificar os biomarcadores na saliva para a detecção de câncer pancreático não invasivo demonstrou que os perfis de transcriptoma salivar são significativamente diferentes entre os pacientes com câncer pancreático e controles saudáveis. Os biomarcadores salivares identificados e validados demonstram poder discriminatório para a detecção de câncer pancreático, com alta especificidade e sensibilidade (Zhang et al., 2010).

O diagnóstico precoce de DM é essencial para melhorar o prognóstico e adiar as complicações clínicas relacionadas ao diabetes. Além disso, o rastreio precoce do DM poderia ser uma estratégia primordial para reduzir a morbimortalidade deste distúrbio metabólico em todo o mundo. Apesar de ser invasivo e doloroso, a análise de sangue por glicosímetro é atualmente viável para rastreio, monitoramento e diagnóstico de DM por punção ungueal (local frequente da retirada do sangue) com agulha. A necessidade constante de perfurar os dedos várias vezes ao dia pela maioria dos pacientes é inconveniente, dolorosa e pode levar ao desenvolvimento de calos e dificuldade em obter amostras de sangue (Dowlaty et al., 2013). Os testes atuais para mensurar a glicemia também desenvolvem calos e diminuem a circulação sanguínea nos dedos, o que prejudica substancialmente a qualidade de vida desses pacientes. Devido a esses inconvenientes, a média de avaliações

glicêmicas é de duas vezes por dia, o que é abaixo dos 4-7 monitoramentos recomendados pelas sociedades médicas de endocrinologia (Fullerton et al., 2014).

Os procedimentos laboratoriais mais utilizados com fins diagnósticos envolvem a análise dos constituintes químicos e celulares do sangue. Além disso, outros constituintes biológicos também são utilizados com esse fim, como a urina, o líquor, sangue e as fezes. Uma diversidade de pesquisas tem avaliado o potencial da saliva como fluido biológico útil nos exames para diagnóstico de doenças sistêmicas ou localizadas na boca (Moura et al., 2007).

Devido a facilidade de coleta da saliva em comparação com o sangue, este fluido biológico tem despertado especial interesse nos pesquisadores. A secreção salivar é um processo controlado por um arco reflexo formado por uma parte aferente e outra eferente. A parte aferente é formada pelos receptores e nervos que conduzem os impulsos, gerados por estímulos da mastigação, gustação e olfação, até o sistema nervoso central. A parte eferente é formada por nervos do sistema nervoso simpático e parassimpático que inervam as glândulas separadamente. O estímulo parassimpático gera uma saliva abundante em volume. Por outro lado, o estímulo simpático para as glândulas salivares resulta em uma secreção de baixo fluxo, viscosa e rica em proteínas (Pedersen et al., 2002).

A saliva é um fluido misto, viscoso, com pH levemente ácido (pH 6-7) contendo água, mucinas, sais orgânicos, proteínas, íons e glicose. O fluxo médio diário de saliva varia entre 1 e 1,5 litros. A contribuição de cada tipo de glândula pode variar muito de acordo com o estímulo. No estado basal a contribuição das diferentes glândulas no fluxo salivar é: 65% das

submandibulares, 20% das parótidas, 7% a 8% das sublinguais, e menos de 10% das numerosas glândulas menores. Associado aos avanços na área de nanobiotecnologia, plataformas diagnósticas são geradas com ênfase na identificação de biomarcadores sensíveis e específicos na saliva para uma série de doenças (Lee e Wong, 2009; Saxena et al., 2017). A saliva é um ultrafiltrado do sangue onde várias moléculas podem atravessar do líquido extracelular para o lúmen salivar via fluxo paracelular ou transcelular nas células acinosas das glândulas salivares. Portanto, os componentes salivares podem ter concentrações semelhantes aos marcadores de sangue, refletindo assim o estado fisiopatológico das doenças sistêmicas. Considerando o peso molecular da insulina, este hormônio pode atravessar as células das glândulas salivares e atingir a saliva em concentrações proporcionais ao sangue (Bagalad et al., 2017).

A saliva é simples de coletar, a coleta não é invasiva, conveniente de armazenar e, em comparação com o sangue, requer menos manipulação durante os procedimentos de diagnóstico. Além disso, a saliva também contém analitos com capacidade de diagnóstico em tempo real (Khaustova et al., 2010; Javaid et al., 2016). Atualmente, um amplo conjunto de métodos utilizados para analisar a saliva inclui imunoensaio, ensaio colorimétrico, análise enzimática, análise cinética, cromatografias e espectrometria de massa (Saxena et al., 2017).

Sabe-se ainda que os biomarcadores encontrados na saliva atraem interesse devido as vantagens sobre o sangue, principalmente como no diagnóstico salivar não-invasivo na infância (Groschl, 2009).

A saliva poderia ser um adequado substituto do sangue para o estudo de complicações metabólicas da obesidade em crianças. Nestes casos a coleta repetida de sangue pode ser traumática e difícil para as crianças. Verifica-se que a insulina plasmática elevada é característica do DM2 e também é proporcional ao conteúdo de gordura corporal. A insulina plasmática diminui paralelamente à perda de peso em crianças obesas. A insulina salivar está linearmente relacionada à insulina plasmática durante o teste de tolerância à glicose e correlaciona-se bem com a concentração plasmática após injeção de insulina (Goodson e Welty, 2014).

Como outra alternativa de diagnóstico salivar, a espectroscopia FTIR tem sido sugerido como tecnologia viável (Nunes et al., 2015). Sendo que, a espectroscopia FTIR está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para detecção e caracterização diagnóstica de moléculas em fluidos biológicos (Bellisola e Sorio, 2012).

A espectroscopia FTIR tem sido largamente utilizada para analisar os vários compostos, orgânicos ou inorgânicos, que fornecem informações valiosas sobre os grupos funcionais da amostra. A absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula, causando por conseguinte, um aumento na amplitude das vibrações moleculares de acordo com a concentração de cada componente na amostra (Lopes e Fascio, 2004).

A espectroscopia FTIR baseia-se na Lei de Hooke, que propõe uma investigação baseada em uma relação linear entre força aplicada em um sistema e sua elongação, ou seja, da concentração de cada componente da amostra com seu grau de vibração (Halliday, 2002; Halliday, 2004).

A Espectroscopia FTIR consiste na produção de um interferograma que utiliza um interferômetro tipo Michelson ou configuração derivada, que é formado por um espelho fixo, um espelho móvel e um divisor de feixe. A radiação que atravessa o divisor é separada, parte é direcionada ao espelho fixo e parte ao espelho móvel, onde é refletida e passa novamente pelo divisor de feixe e é recombinada, no qual um filme semireflector bissecta o plano de dois espelhos (beamsplitter). Os espectros são obtidos pelo cálculo da transformada de Fourier do referido interferograma reproduzidos na forma de um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal denominado interferograma (Halliday, 2002; Halliday, 2004).

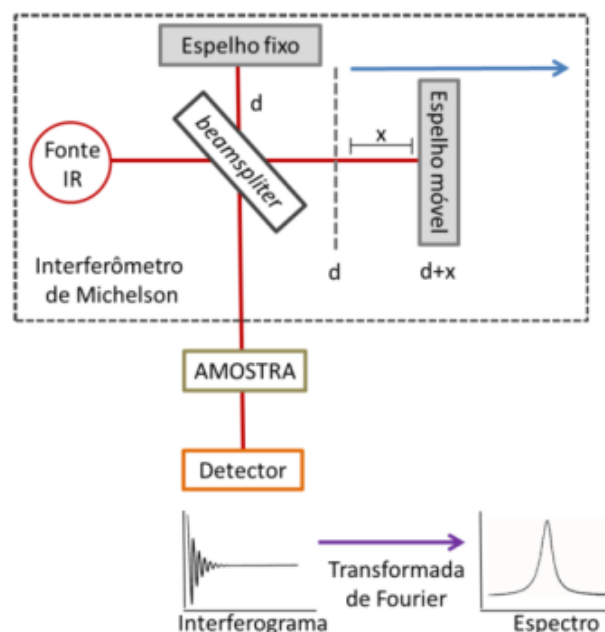


Figura 2: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Halliday, 2004).

Para realização da espectroscopia FTIR, a radiação infravermelha atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro irá registrar o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da

presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho possibilita que os átomos e grupos de átomos presentes em compostos orgânicos vibrem com uma maior amplitude ao redor das ligações covalentes que os unem (Silverstein, 2000).

Sendo assim, o processo é quantificado, porém o espectro vibracional pode aparecer como uma série de bandas, porque a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, por conseguinte, as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro. As posições das bandas no espectro podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inverso ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) ou em micrômetros ($2,5 - 16 \mu\text{m}$) (Ojeda et al., 2012).

Desta forma, a espectroscopia FTIR é uma técnica analítica físico-química global, sensível e altamente reprodutível que identifica moléculas estruturais com base na absorção de radiação infravermelha. Considerando que cada biomolécula apresenta estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro diferente na espectroscopia FTIR (Ojeda et al., 2012). Um algoritmo baseado em modos vibracionais detectados por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) da saliva irá ser utilizado na detecção da insulina na saliva. Visto que, o estudo do logaritmo surgiu, sobretudo, como um auxílio na solução de equações exponenciais. Ele está presente, também, em modelos matemáticos utilizados em várias áreas, como exemplo temos que, a e b como números reais positivos, chama-se logaritmo de b na base a , o expoente em que a deve ser elevado de modo que a potência obtida de base a seja igual a b .

$$\log_a b = x \Leftrightarrow a^x = b$$

Com $a > 0$, $a \neq 1$ e $b > 0$

Assim, o logaritmo nada mais é que um expoente. Dizemos que "a" é a base do logaritmo, "b" é o logaritmando e "x" é o logaritmo (Dolce *et al.*, 1997).

2. ANEXO

“ALGORÍTIMO PARA DETECÇÃO DE INSULINA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS BASEADO EM COMPONENTES SALIVARES DETECTADOS POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FTIR PARA UTILIZAÇÃO COMO PLATAFORMA DIAGNÓSTICA”

[1] Campo da Invenção

[2] A presente invenção refere-se à seleção de um algoritmo baseado em modos vibracionais detectados por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) da saliva para ser utilizado na detecção da insulina em fluidos biológicos, especialmente a saliva. Esta análise hormonal é realizada por parâmetros obtidos por processamento de sinal baseado em uma técnica não destrutiva como a (FTIR), do qual origina um modelo matemático aplicado à mensuração pretendida. O modelo matemático é calibrado através do processamento de dados da propriedade a inspecionar sobre amostras conhecidas. Especificamente, a presente invenção compreende um algoritmo baseado (i) na área do espectro original entre $1620,9\text{ cm}^{-1}$ e $1720,7\text{ cm}^{-1}$ e (ii) no vetor de intensidade do modo vibracional do espectro salivar em 1542 cm^{-1} . Este espectro do FTIR foi obtido em um sistema de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) utilizando saliva artificial com diferentes concentrações de insulina, saliva artificial pura e insulina diretamente sobre o cristal para análise do ATR-FTIR. Este algoritmo tem potencial para ser utilizado como ferramenta complementar para mensuração rápida, indolor e não-invasiva da insulina em fluidos biológicos como a saliva, urina e líquido.

[3] Estado da Técnica

[4] Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia que resulta da insuficiente secreção e/ou redução da ação da insulina em tecidos periféricos. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF) há uma estimativa de 415 milhões de adultos com diagnóstico de diabetes em todo o mundo, no entanto há uma estimativa de mais 193 milhões de pacientes potencialmente com DM e sem o devido diagnóstico (Skyler et al., **Diabetes**, v.66, p.241- 255, 2017).

[5] Uma característica do quadro clínico de DM, que é uma doença auto-imune, é a função e/ou secreção de insulina diminuída com reduzido controle glicêmico. O Diabetes tem sido classificado em dois tipos: Diabetes mellitus Tipo 1 (DM1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Chopra, **National Center for Biotechnology Information** (US), 2012). O DM1 é classificado como uma doença autoimune que resulta de uma combinação de susceptibilidade genética, desregulação imunológica e exposição a causas ambientais (como, por exemplo, infecções virais), que levam à morte das células beta e consequente deficiência na produção de insulina. O DM2 tem uma patogênese complexa que tem sido extensivamente estudada. Está estabelecido que o sedentarismo e a obesidade são os principais fatores que contribuem para o desencadeamento da doença, embora possa haver fatores genéticos de predisposição e ambientais que contribuem para estimular o aparecimento da doença (Maschio, **Possível ativação da via de sinalização da Wnt/ β -Catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo animal de resistência periférica à insulina.**

Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 83p., 2014).

[6] Em humanos, a insulina é produzida pelas células β que estão localizadas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas. Aproximadamente 80% das células das ilhotas são compostas de células β , e redução ou ausência de função destas células em indivíduos com diabetes leva a baixa ou uma completa falta de secreção de insulina (Chopra, **National Center for Biotechnology Information** (US), 2012). Assim, tem havido um grande interesse na determinação das vias envolvidas no aumento das células beta pancreáticas e a aplicação deste conhecimento em terapias moleculares e celulares do diabetes. Em especial, a via de sinalização da Wnt/beta-catenina (ou via Wnt canônica) tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Várias mutações na via Wnt (família de glicolipoproteína) estão invariavelmente ligadas a defeitos congênitos humanos e detecção precoce no tumor de pâncreas. Assim, em determinados órgãos, é sabido que a proteína beta-catenina constitui não somente um componente estrutural das junções de adesão, mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com a Wnt, participando de vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação. Hiperplasia da célula beta parece ocorrer em certas condições experimentais e *in vivo*, como no estado de resistência periférica à insulina. Entretanto, as vias intracelulares envolvidas nesse processo ainda permanecem desconhecidas (Maschio, **Possível ativação da via de sinalização da Wnt/B-Catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo animal de resistência periférica à insulina**. Dissertação de Mestrado

apresentada a Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 83p., 2014).

[7] O câncer de pâncreas é o segundo mais freqüente de malignidade gastrointestinal. No geral, é a quarta causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer, refletindo o seu avançado estágio de apresentação. A detecção precoce de câncer pancreático oferece a promessa de melhoria das taxas de mortalidade após a ressecção cirúrgica. Um obstáculo significativo para a detecção precoce do câncer de pâncreas é o desenvolvimento de métodos que eficientemente possam identificar os indivíduos potencialmente afetados. Existem estratégias atuais para detecção precoce de câncer pancreático; no entanto, elas estão confinadas a um pequeno número de pacientes de maior risco, muitas vezes contando com procedimentos invasivos, ou falta-lhes a necessária sensibilidade e especificidade para fazer o seu rastreio generalizado e aplicável. A busca de biomarcadores úteis em potencial do câncer pancreático é ainda mais complicada pela existência de várias doenças pancreáticas benignas como a pancreatite crônica, que tem sobreposição fenotípica com início de câncer pancreático. A falta de biomarcadores de câncer de pâncreas altamente específicos é muitas vezes devido à sua presença em pacientes com pancreatite crônica (Hu et al., **Clin Cancer Res**, v.14, p.6246–6252, 2008).

[8] Como um espelho do corpo, a saliva é facilmente acessível e não invasiva. Os componentes salivares, incluindo DNA, RNA, proteínas e bactérias têm sido amplamente ligados a ciências forenses, doença bucal, e doença sistêmica. Assim, uma abordagem de detecção de alta especificidade para identificar os biomarcadores na saliva para a detecção de câncer pancreático não invasivo

demonstrou que os perfis de transcriptoma salivar são significativamente diferentes entre os pacientes com câncer pancreático e controles saudáveis. Os biomarcadores salivares identificados e validados demonstram poder discriminatório para a detecção de câncer pancreático, com alta especificidade e sensibilidade (Zhang et al., **Gastroenterology**, v.138, n.3, p.949–957, 2010).

[9] O diagnóstico precoce de DM é essencial para melhorar o prognóstico e adiar as complicações clínicas relacionadas ao diabetes. Além disso, o rastreio precoce do DM poderia ser uma estratégia primordial para reduzir a morbimortalidade deste distúrbio metabólico em todo o mundo. Apesar de ser invasivo e doloroso, a análise de sangue por glicosímetro é atualmente viável para rastreio, monitoramento e diagnóstico de DM por punção ungueal com agulha. A necessidade constante de perfurar os dedos várias vezes ao dia pela maioria dos pacientes é inconveniente, dolorosa e pode levar ao desenvolvimento de calos e dificuldade em obter amostras de sangue (Dowlaty et al., **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.16, n.4, p.466-472, 2013).

[10] Os procedimentos laboratoriais mais utilizados com fins diagnósticos envolvem a análise dos constituintes químicos e celulares do sangue. Além disso, outros constituintes biológicos também são utilizados com esse fim, como a urina, o líquido, sangue e as fezes. Uma diversidade de pesquisas tem avaliado o potencial da saliva como fluido biológico útil nos exames para diagnóstico de doenças sistêmicas ou localizadas na boca (Moura et al., **Pesq Bras Odonto Pediatría e Clínica Integ**, v.7, n.2, p.187-194, 2007).

[11] O fato de a saliva poder ser facilmente coletada quando comparada à coleta de sangue, tem despertado especial interesse nos pesquisadores. Associado aos avanços na área de nanobiotecnologia, plataformas

diagnósticas são geradas com ênfase na identificação de biomarcadores sensíveis e específicos na saliva para uma série de doenças (Lee e Wong, **Am J Dent**, v.22, n.4, p.241–248, 2009; Saxena et al., **Advanced Biomedical Res**, v.6, p.90, 2017). Adicionalmente, a saliva é um ultrafiltrado do sangue onde várias moléculas podem atravessar do líquido extracelular para o lúmen salivar via fluxo paracelular ou transcelular nas células acinosas das glândulas salivares. Considerando o peso molecular da insulina, este hormônio pode atravessar as células das glândulas salivares e atingir a saliva em concentrações proporcionais ao sangue. Portanto, os componentes salivares podem ter concentrações semelhantes aos marcadores de sangue (glicose, insulina, cortisol, adiposinas), refletindo assim o estado fisiopatológico das doenças sistêmicas (Bagalad et al., **Dent Res J**, v.14, n.1, p.13-18, 2017).

[12] A saliva é simples de coletar, a coleta não é invasiva, conveniente de armazenar e, em comparação com o sangue, requer menos manipulação durante os procedimentos de diagnóstico. Além disso, a saliva também contém analitos com capacidade de diagnóstico em tempo real (Khaustova et al., **Analyst.**, v.135, n.12, p.3183-3192, 2010; Javaid et al., **J Oral Biology Craniofacial Res**, v.6, p.67-76, 2016). Atualmente, um amplo conjunto de métodos utilizados para analisar a saliva inclui imunoensaio, ensaio colorimétrico, análise enzimática, análise cinética, cromatografias e espectrometria de massa (Saxena et al., **Advanced Biomedical Res**, v.6, p.90, 2017). Sabe-se ainda que os biomarcadores encontrados na saliva atraem interesse devido as vantagens sobre o sangue, principalmente como no diagnóstico salivar não-invasivo na infância (Groschl, **Bioessays**, v.31, n.8, p.843-852, 2009).

[13] A saliva poderia ser um adequado substituto do sangue para o estudo de complicações metabólicas da obesidade em crianças. Nestes casos a coleta repetida de sangue pode ser traumática e difícil para as crianças. Verifica-se que a insulina plasmática elevada é característica do DM2 e também é proporcional ao conteúdo de gordura corporal. A insulina plasmática diminui paralelamente à perda de peso em crianças obesas. A insulina salivar está linearmente relacionada à insulina plasmática durante o teste de tolerância à glicose e correlaciona-se bem com a concentração plasmática após injeção de insulina (Goodson e Welty, **Diabetes Management**, v.4, n.5, p.463-465, 2014).

[14] A insulina salivar avaliada em sujeitos em condições normais e diabéticos tipo 1 demonstrou uma correlação significativa entre os níveis séricos de insulina e insulina salivar ($r = 0,81$; $P < 0,01$ em não-diabéticos e $r = 0,91$; $P < 0,001$ em diabéticos tipo 1) (Pasic e Pickup, **Diabetes Care**, v.11, n.6, p.489-494, 1988.). No entanto, devido aos vários perfis individuais revelarem acentuada discrepância entre a distribuição e a magnitude das alterações de insulina, esses autores não recomendaram as concentrações de insulina salivar como um índice confiável da insulinemia. Mais recentemente, estudos demonstraram que as concentrações de insulina salivares foram aproximadamente 10 vezes inferiores do que as concentrações de insulina sérica (Fabre et al., **Endocr Connect**, v.1, p.58-61, 2012).

[15] Como outra alternativa de diagnóstico salivar, a espectroscopia FTIR tem sido sugerido como tecnologia viável (Nunes et al., **Biochemia Medica**, v.25, n.2, p.177-192, 2015). Sendo que, a espectroscopia FTIR está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para a detecção e

caracterização diagnóstica de moléculas em fluidos biológicos (Bellisola e Sorio, **Am J Cancer Res**, v.2, p.1-21, 2012).

[16] A espectroscopia FTIR tem sido largamente utilizada para analisar os vários compostos, orgânicos ou inorgânicos, que fornecem informações valiosas sobre os grupos funcionais da amostra. A absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula, causando por conseguinte, um aumento na amplitude das vibrações moleculares de acordo com a concentração de cada componente na amostra (Lopes e Fascio, **Química Nova**, v.27, n. 4, p.670-673, 2004).

[17] A espectroscopia FTIR baseia-se na Lei de Hooke, que propõe uma investigação baseada em uma relação linear entre força aplicada em um sistema e sua elongação, ou seja, da concentração de cada componente da amostra com seu grau de vibração (Halliday, **Fundamentos de Física 1-Mecânica**, 6th, p.277, 2002; Halliday, **Física 2**, 5th (1), 384 p., 2004).

[18] A Espectroscopia FTIR consiste na produção de um interferograma que utiliza um interferômetro tipo Michelson ou configuração derivada, que é formado por um espelho fixo, um espelho móvel e um divisor de feixe. A radiação que atravessa o divisor é separada, parte é direcionada ao espelho fixo e parte ao espelho móvel, onde é refletida e passa novamente pelo divisor de feixe e é recombinada, no qual um filme semireflector bissecta o plano de dois espelhos (beamsplitter). Os espectros são obtidos pelo cálculo da transformada de Fourier do referido interferograma reproduzidos na forma de um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal denominado interferograma

(Halliday, **Fundamentos de Física 1-Mecânica**, 6th, p.277, 2002; Halliday, **Física 2**, 5th (1), 384 p., 2004).

[19] Para realização da espectroscopia FTIR, a radiação infravermelha atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro irá registrar o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho possibilita que os átomos e grupos de átomos presentes em compostos orgânicos vibrem com uma maior amplitude ao redor das ligações covalentes que os unem (Silverstein, **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6.ed., 460 p., 2000).

[20] Sendo assim, o processo é quantificado, porém o espectro vibracional pode aparecer como uma série de bandas, porque a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, por conseguinte, as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro. As posições das bandas no espectro podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inverso (4000 - 400 cm^{-1}) ou em micrômetros (2,5 - 16 μm) (Ojeda et al., **Methods in Molecular Biology**, v.88, p.187-211, 2012).

[21] Desta forma, a espectroscopia FTIR é uma técnica analítica físico-química global, sensível e altamente reprodutível que identifica moléculas estruturais com base na absorção de radiação infravermelha. Considerando que cada biomolécula apresenta estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro

diferente na espectroscopia FTIR (Ojeda et al., **Methods in Molecular Biology**, v.88, p.187-211, 2012).

[22] Na busca por patentes que tenham realizado a quantificação de insulina por meio de técnicas de espectroscopia encontramos apenas as seguintes patentes que apresentam relação parcial com este tema sem reivindicações de mensuração de insulina em fluidos biológicos por meio de FTIR:

[23] A patente US5553616A descreve meio para determinar substâncias biológicas usando espectroscopia raman, no entanto, a análise é focada apenas na determinação da glicose, sem a quantificação de insulina.

[24] A patente US5079421A demonstrou a possibilidade de detectar componentes biológicos do sangue mensurados por meio de FTIR utilizando uma membrana semipermeável. Esta análise por meio desse dispositivo proporcionou um mensuramento da glicose em situações onde houve a prévia administração de insulina. Considerando que a insulina pode reduzir a glicemia destaca-se que a participação da insulina foi apenas um meio para promover variabilidade da concentração de glicose.

[25] A patente US6421548B1 demonstrou a possibilidade de detectar glicose no sangue por meio de um dispositivo que utiliza espectroscopia ATR-FTIR. O dispositivo foi usado com sangue da ponta de dedo com intuito de comparar duas regiões específicas de um espectro infravermelho mensurado para determinar o nível de glicose no sangue do paciente.

[26] A patente US20150250404A1 demonstrou a possibilidade de detectar resistência à insulina, diabetes e complicações da diabetes, utilizando um oxímetro através da análise espectral da pletismografia de foto arterial. O método compreende a realização de uma análise espectral usando

Transformação Rápida de Fourier (FFT). No entanto, apesar de alterações dos níveis de insulina plasmática serem relacionados com os índices mensurados a insulina não foi quantificada por esta técnica.

[27] A patente US8728753B2 demonstrou a possibilidade de medir em amostras biológicas o nível do receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R) utilizando espectrometria de massa com Monitoramento por Reação Seleccionada (SRM) e também espectrometria de massa de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM). A análise da medida do IGF1R é importante para avaliação da atividade funcional da insulina, no entanto, a detecção de insulina no fluido biológico não foi realizada.

[28] A patente WO2014026113A1 demonstrou um método não-invasivo e preciso para determinar um analito na corrente sanguínea de um mamífero. A possibilidade de detectar glicose no sangue é dirigida a um patch para transmissão e detecção de uma fluorescência resultante.

[29] A patente CN100421615C refere-se a parâmetros biológicos monitorados pelo analisador compacto baseado em ensaios colorimétricos. Esta análise de glicose ocorre por meio desse dispositivo com características diferentes da espectroscopia de infravermelho.

[30] A patente US5995860A abrange um dispositivo para medir o nível de glicose sanguínea, e inclui uma fonte infravermelha implantável e um módulo sensor para direcionar a radiação infravermelha através do tecido vascular e para detectar a radiação infravermelha depois de passar pelo tecido e gerar um sinal de saída representativo da radiação infravermelha detectada.

[31] A patente US7027848B2 refere-se a um sistema de espectroscopia quantitativa para medir as concentrações de analito ou outros atributos do

tecido utilizando técnicas não invasivas em combinação com análise multivariada. Neste invento foi demonstrado um método para construir modelos de calibração aprimorados que usam uma medição de referência de analito combinada para assegurar que a relação correta entre o espectro e a medição de referência do analito seja feita durante o processo de calibração e um sistema incorporando o modelo de calibração desenvolvido.

[32] Desta forma, não é do nosso conhecimento qualquer método capaz de quantificar insulina em fluidos biológicos via FTIR ou ATR-FTIR, como descrito nesta invenção. Considerando que a mensuração de insulina pode contribuir como ferramenta auxiliar no diagnóstico de doenças como diabetes e câncer de pâncreas e que o diagnóstico precoce facilita o tratamento, diminui custos e diminui aspectos de morbidade destas doenças, acreditamos que a utilização destes achados pode contribuir para redução da morbimortalidade em doenças relacionadas com alteração da secreção de insulina

[33] A presente invenção poderá ser mais bem compreendida por meio da descrição dos resultados obtidos. Os procedimentos experimentais envolvidos estão detalhados a seguir.

[34] **Metodologia Empregada**

[35] Essa invenção caracteriza-se pela utilização de um algoritmo capaz de quantificar a concentração de insulina em fluidos biológicos detectados por espectroscopia ATR-FTIR. Considerando que esta invenção pode demonstrar um meio alternativo de quantificação de insulina de forma rápida, não-invasiva e com alta sensibilidade, esta invenção pode ser aplicada em análises de sensibilidade à insulina em fluidos biológicos como saliva, urina, lágrima, suor, sangue e plasma.

[36] Esta invenção apresenta diversas vantagens operacionais para mensuração de insulina, especialmente baixo custo operacional e de análise, rapidez para realização da mensuração e possibilidade de avaliação não invasiva com alguns fluidos biológicos. Essa invenção ainda possui a vantagem de preservar as amostras avaliadas, sem causar qualquer dano físico, químico ou estrutural nos fluidos biológicos.

[37] A utilização desta invenção também permite análises em uma quantidade de fluido bastante reduzida (2 microlítros), fato que facilita sua aplicação biomédica, principalmente em áreas da Pediatria e Medicina não-invasiva.

[38] Para esta invenção foi utilizado saliva artificial com os seguintes componentes: Cloreto de Sódio 0,08%; Cloreto de Potássio 0,12%; Citrato de Potássio 0,03%; Carboximetil Celulose 1%; Carbonato de Cálcio 0,015%; Sorbitol Líquido 3%; Água Deionizada QSP 100 ml.

[39] A seguir, descreveremos o preparo das soluções utilizadas neste processo. Para mensuração e para diluição da saliva artificial (0 U/ μ L de insulina) , este fluido foi diluído em água destilada na diluição de 1:1.

[40] As análises de insulina diluída em saliva artificial em concentrações crescentes deste hormônio foram realizadas em 3 concentrações ($1,5 \times 10^{-3}$ U/ μ L; $6,25 \times 10^{-3}$ U/ μ L; 50×10^{-3} U/ μ L). Adicionalmente, foi realizada uma análise da insulina sem diluição com saliva [forma pura] (100×10^{-3} U/ μ L). Para a amostra da concentração $1,5 \times 10^{-3}$ U/ μ L foi utilizado 49,21875 μ L Saliva + 0,78125 μ L Insulina (0,078125 U); para a amostra em $6,25 \times 10^{-3}$ U/ μ L foi utilizado 46,875 μ L Saliva + 3,125 μ L Insulina (0,3125 U) e para amostra em 50×10^{-3} U/ μ L foi utilizado 25 μ L Saliva + 25 μ L Insulina (2,5 U).

[41] Em seguida, 2 μL de cada amostra ($0 \text{ U}/\mu\text{L}$; $1,5 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $6,25 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$; $50 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ e $100 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$) foram colocadas sobre o cristal e secas com ar comprimido durante 3 min. Desta forma, ocorreu a formação de uma película e as análises de FTIR foram sempre realizadas em duplicata para garantir a confiabilidade do teste. Entre a análise de cada amostra o cristal foi limpo, com álcool 70%, para remoção completa da amostra, evitando contaminação na análise pois o álcool apresenta rápida volatilidade.

[42] O material de cristal na unidade ATR é um disco de diamante como elemento de reflexão interna. A profundidade de penetração da película de insulina varia entre 0,1 e 2 μm e depende do comprimento de onda, ângulo de incidência do feixe e do índice de refração do material de cristal ATR. No cristal ATR o raio infravermelho é refletido na interface em direção à amostra. Os espectros de amostras e background foram realizados com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras foram realizadas para análise salivar.

[43] Exemplos

[44] Para uma melhor compreensão das características da presente invenção, são apresentados os resultados dos gráficos exemplificadores, os quais representam uma forma de análise.

[45] Exemplo 1: Refere-se as diferentes concentrações de insulina, discriminando 5 diferentes concentrações deste hormônio em saliva artificial com quantidades crescentes de insulina representado pela FIGURA 1 a qual apresenta um espectro médio da saliva nestas concentrações citadas no espectro entre $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

[46] Exemplo 2: Refere-se a região de análise para o desenvolvimento do algoritmo que compreende o espectro entre $1750\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$. Representado

pela FIGURA 2 que apresenta um espectro médio da saliva artificial sem insulina, da saliva artificial com soluções crescentes de insulina e da insulina pura no espectro entre 1750-1500 cm^{-1} .

[47] Exemplo 3: TABELA 1: Representa a área do modo vibracional entre 1620,9 cm^{-1} e 1720,7 cm^{-1} de cada amostra e também a intensidade do modo vibracional em 1542 cm^{-1} para cada amostra.

[48] Exemplo 4: Cálculo do algoritmo para cada amostra representado pela FIGURA 3. A FIGURA 3 apresenta a correlação de Pearson com análise estatística da comparação entre as concentrações conhecidas de insulina com a aplicação da mensuração de insulina por FTIR após a aplicação do algoritmo:

[49] Cálculo do algoritmo usando a seguinte fórmula:

[50] $X = \{[(\text{área do modo vibracional entre } 1620,9 \text{ cm}^{-1} \text{ e } 1720,7\text{cm}^{-1} \text{ da amostra} \times 30) + (\text{intensidade do modo vibracional em } 1542 \text{ cm}^{-1} \text{ da amostra})] - [(\text{área do modo vibracional entre } 1620,9 \text{ cm}^{-1} \text{ e } 1720,7\text{cm}^{-1} \text{ da amostra sem a presença de insulina} \times 30) + (\text{intensidade do modo vibracional em } 1542 \text{ cm}^{-1} \text{ da amostra sem a presença de insulina})]\}$.

[51] Amostra saliva artificial sem insulina:

$$X = \{[(6,3865 \times 30) + (0,0445)] - [(6,3865 \times 30) + (0,0445)]\}$$

$$x = \{[(191,595 + 0,0445) - (191,595 + 0,0445)]\}$$

$$x = \{[(191,6395) - (191,6395)]\}$$

$$X = 0$$

[52] Amostra $1,5 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$:

$$x = \{[(7,521 \times 30) + (0,0536)] - [(6,3865 \times 30) + (0,0445)]\}$$

$$x = \{[(225,63 + 0,0536) - (191,595 + 0,0445)]\}$$

$$x = \{[(225,6836) - (191,6395)]\}$$

$$X = 34,0441$$

[53] Amostra $6,25 \times 10^{-3}$ U/ μ L:

$$x = \{[(8,125 \times 30) + (0,0596)] - [(6,3865 \times 30) + (0,0445)]\}$$

$$x = \{[(243,75 + 0,0596) - (191,595 + 0,0445)]\}$$

$$x = \{[(243,8096) - (191,6395)]\}$$

$$X = 52,1701$$

[54] Amostra 50×10^{-3} U/ μ L:

$$x = \{[(10,2705 \times 30) + (0,0913)] - [(6,3865 \times 30) + (0,0445)]\}$$

$$x = \{[(308,115 + 0,0913) - (191,595 + 0,0445)]\}$$

$$x = \{[(308,2063) - (191,6395)]\}$$

$$X = 116,5668$$

[55] Amostra 100×10^{-3} U/ μ L:

$$x = \{[(17,1995 \times 30) + (0,1924)] - [(6,3865 \times 30) + (0,0445)]\}$$

$$x = \{[(515,985 + 0,1924) - (191,595 + 0,0445)]\}$$

$$x = \{[(516,1774) - (191,6395)]\}$$

$$X = 324,5379$$

FIGURA 1

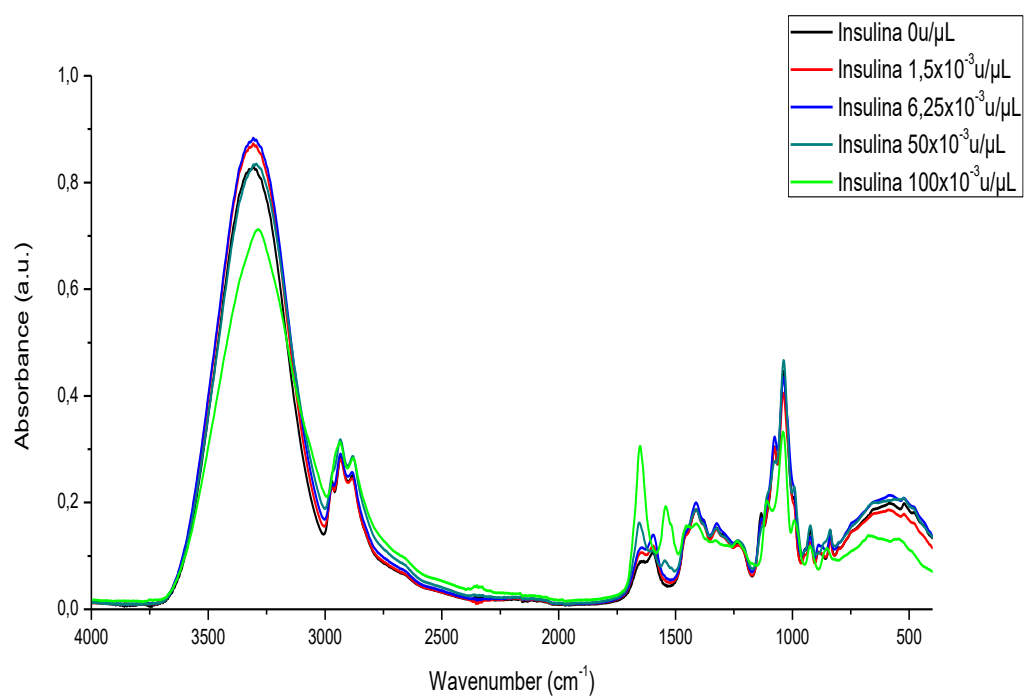


FIGURA 2

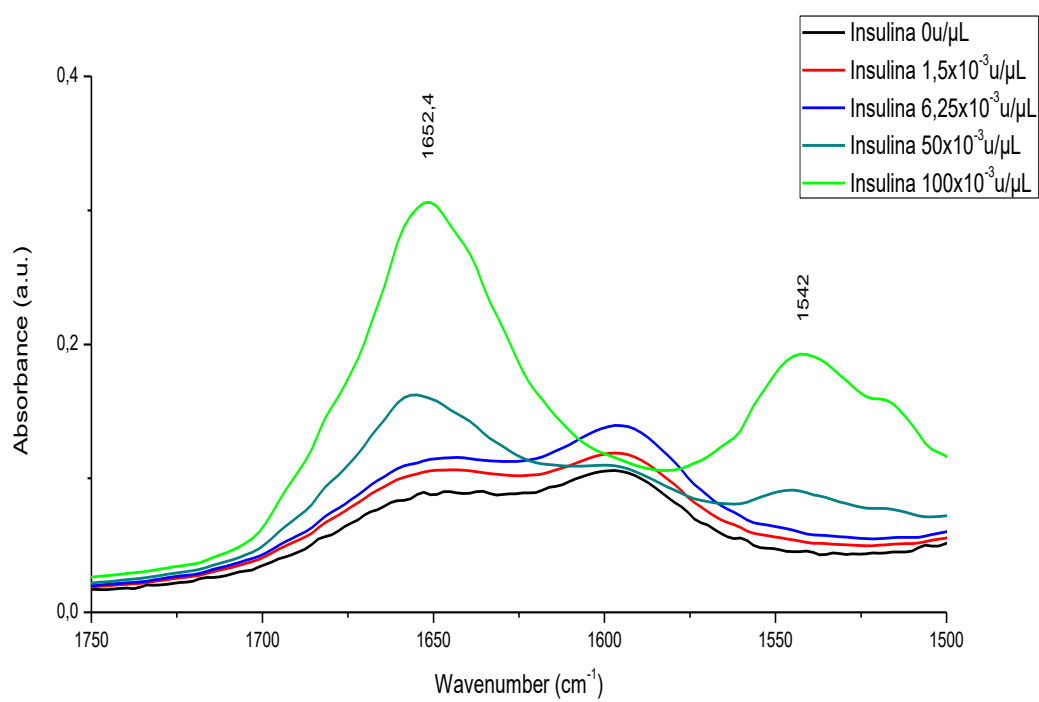
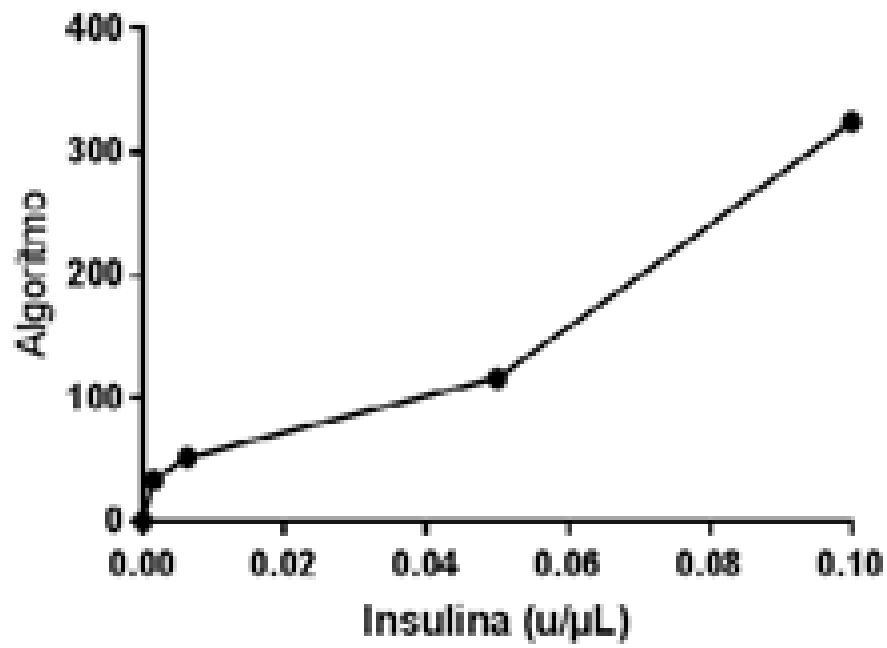


TABELA 1

Concentração de Insulina (U/ μ L)	Área (1620,9 - 1720,7 cm^{-1})	Intensidade (1542 cm^{-1})	Resultado Algorítimo
0	6,3865	0,0445	0,0
$1,5 \times 10^{-3}$	7,521	0,0536	34,0441
$6,25 \times 10^{-3}$	8,125	0,0596	52,1701
50×10^{-3}	10,2705	0,0913	116,5668
100×10^{-3}	17,1995	0,1924	324,5379

FIGURA 3

 $r = 0,9769$ $p = 0,0042$ 

REIVINDICAÇÕES

- 1) Aplicação do sistema de quantificação do hormônio insulina caracterizado por ser constituído de uma análise de dois modos vibracionais do espectro de FTIR baseado (i) na área do espectro original entre $1620,9\text{ cm}^{-1}$ e $1720,7\text{ cm}^{-1}$ e (ii) no vetor de intensidade do modo vibracional do espectro salivar em 1542 cm^{-1} .
- 2) Aplicação do algoritmo de quantificação de insulina via FTIR de acordo com reivindicação 1 para análises de quantificação deste hormônio em fluidos biológicos como saliva, urina, lágrima, suor, sangue e outras secreções.
- 3) Aplicação de variáveis do algoritmo, baseadas nos mesmos modos vibracionais desta invenção, para quantificação de insulina via FTIR de acordo com reivindicação 1.
- 4) Aplicações do algoritmo de acordo com a reivindicação 1, ou suas variáveis de acordo com sua reivindicação 3, para análises de sensibilidade à insulina em momentos que se correlaciona as concentrações de insulina e glicose em fluidos biológicos.
- 5) Aplicações do algoritmo de acordo com a reivindicação 1, ou suas variáveis de acordo com sua reivindicação 3, para seu uso como ferramenta complementar de diagnóstico de tumores de pâncreas com alta produção de insulina.
- 6) Aplicação do algoritmo de acordo com a reivindicação 1, ou suas variáveis de acordo com sua reivindicação 3, caracterizada por utilizar amostras como saliva, soro, urina, lágrimas, suor, secreções, tecidos, além de amostras de

alimentos ou ambientais, contendo insulina capaz de ser reconhecidas por sondas nos mesmos modos vibracionais.

7) Aplicação do algoritmo de acordo com a reivindicação 1, ou suas variáveis de acordo com sua reivindicação 3, caracterizado pelo uso de técnicas fotônicas como FTIR, ATR-FTIR e raman.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. Supplement 1, p. S11-S24, Jan 2017.

BAGALAD, B.S.; MOHANKUMAR, K.P.; MADHUSHANKARI, G.S.; DONOGHUE, M.; KUBERAPPA, P.H. Diagnostic accuracy of salivary creatinine, urea, and potassium levels to assess dialysis need in renal failure patients. **Dent Res J**, v. 14, n. 1, p. 13-18, Jan-Feb 2017. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.201138>

BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. **Am J Cancer Res**, v.2, n. 1, p.1-21, 2012.

CHOPRA, A. ⁶⁴Cu-Labeled 1,4,7-tris(acetic acid)-10-vinylsulfone-1,4,7,10-tetraazacyclododecane conjugated to Cys40-Exendin-4. 2011 Aug 24 [Updated 2012 Mar 15]. In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): **National Center for Biotechnology Information** (US), 2012.

DOLCE, O.; IEZZI, G.; MURAKAMI, C. **Fundamentos de Matemática Elementar. Logaritmos**, Vol. 2. São Paulo: Atual, 1997.

DOWLATY, N.; YOON, A.; GALASSETTI, P. Monitoring states of altered carbohydrate metabolism via breath analysis: are times ripe for transition from potential to reality? Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.16, n.4, p. 466-472, 2013. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328361f91f>

FABRE, B.; MACCALLINI, G.; ONETO, A.; GONZALEZ, D.; HIRSCHLER, V.; ARANDA, C.; BERG, G. Measurement of fasting salivary insulin and its relationship with serum insulin in children. **Endocr Connect**, v.1, p. 58-61, 2012. <https://doi.org/10.1530/EC-12-0024>

FULLERTON, B.; JEITLER, K.; SEITZ, M.; HORVATH, K.; BERGHOLD, A, SIEBENHOFER, A. Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. 1-152, Feb 2014.

GOODSON JM.; WELTY F.K. Using salivary biomarkers to identify children at risk of Type 2 diabetes. **Diabetes Management**, v.4, n. 5, p. 463-465, 2014.

GROSCHL, M. The physiological role of hormones in saliva. **Bioessays**, v.31, n. 8, p. 843-852, 2009. <https://doi.org/10.1002/bies.200900013>

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física 1-Mecânica**. 6th Ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, p. 277, 2002.

HALLIDAY, D.; RESNIK, R.; KRANE, D. S. **Física 2**. 5th Ed. Rio de Janeiro: LTC, v.1, 384 p., 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, Sixth edition, 2015. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 16 abr. 2018.

JAVAID, M.A.; AHMED, A.S.; DURAND, R.; TRAN, S.D. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. **J Oral Biology and Craniofacial Res**, v.6, p. 67-76, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>

HU, S.; ARELLANO, M.; BOONTHEUNG, P. et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. **Clin Cancer Res**, v.14, p. 6246–6252, 2008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5037>

KHAUSTOVA, S.; SHKURNIKOV, M.; TONEVITSKY, E.; ARTYUSHENKO, V.; TONEVITSKY, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst.**, v.135, n.12, p. 3183-3192, Dec 2010. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>

LEE, Y.H.; WONG, D.T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent**, v.22, n. 4, p. 241–248, Aug. 2009.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n. 4, p. 670-673, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400025>

MASCHIO, D.A. **Possível ativação da via de sinalização da Wnt/ β -Catenina no processo de hiperplasia compensatória da célula beta pancreática em modelo animal de resistência periférica à insulina**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 83 p., 2014.

MOURA, S.A.B.; MEDEIROS, A.M.C.; COSTA, F.R.H, MORAES PH, OLIVEIRA FILHO AS. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesq Bras Odontopediatria e Clínica Integ**, v.7, n. 2, p. 187-194, mai-ago 2007.

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**, v.25, n. 2, p. 177-192, 2015. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>

OJEDA, J.J.; DITTRICH, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. **Methods in molecular biology**, v.881, p. 187-211, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8

PASIC, J.; PICKUP, J.C.; Salivary insulin in normal and type I diabetic subjects. **Diabetes Care.**, v.11, n. 6, p. 489-494, 1988. <https://doi.org/10.2337/diacare.11.6.489>

PEDERSEN, A. M.; BARDOW, A.; BEIER JENSEN, S.; NAUNTOFTE, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis**, v. 8, n. 5, p. 117-129, May 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>

SAXENA, S.; SANKHLA, B.; SUNDARAGIRI, K. S.; BHARGAVA, A. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. **Advanced Biomedical Res**, v.6, p.90, 2017. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.211801>

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 460 p., 2000.

SKYLER, J.S.; BAKRIS, G.L.; BONIFACIO, E. et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. **Diabetes**, v.66, p. 241-255, 2017. <https://doi.org/10.2337/db16-0806>

ZHANG, L.; FARRELL, J.J.; ZHOU, H.; ELASHOFF, D.; AKIN, D.; PARK, NO-HEE; CHIA, D.; WONG, D.T. Salivary Transcriptomic Biomarkers for Detection of Resectable Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v.138, n. 3, p. 949–957, 2010. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.010>