

FERNANDA BRANDÃO DE SOUSA

**ASSINATURA ESPECTRAL DA SALIVA  
HUMANA POR MEIO DA  
ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR EM  
LACTENTES COM ALEITAMENTO  
MATERNO EXCLUSIVO OU MISTO**

*DIFFERENTIAL SEPECTRAL SIGNATURE OF HUMAN SALIVA USING ATR-FTIR  
EPSCROSCOPY IN EXCLUSIVE BREASTFEEDING AND SUPPORTING  
BREASFEEDING INFANTS*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da  
Universidade de Uberlândia, para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica  
Integrada.

Uberlândia, 2019

FERNANDA BRANDÃO DE SOUSA

**ASSINATURA ESPECTRAL DA SALIVA  
HUMANA POR MEIO DA  
ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR EM  
LACTENTES COM ALEITAMENTO  
MATERNO EXCLUSIVO OU  
ALEITAMENTO MISTO**

*DIFFERENTIAL SEPECTRAL SIGNATURE OF HUMAN SALIVA USING ATR-FTIR  
EPSCROSCOPY IN EXCLUSIVE BREASTFEEDING AND SUPPORTING  
BREASFEEDING INFANTS*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr Robinson Sabino Silva  
Coorientadora: Prof.Dr<sup>a</sup>. Fabiana Sodré de Oliveira

Banca Examinadora: Prof. Dr Robinson Sabino Silva  
Prof. Dr Leandro José Raniero  
Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielly Cunha Araújo Ferreira de Oliveira

Uberlândia, 2019

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

---

S725a  
2019      Sousa, Fernanda Brandão de, 1989  
Assinatura espectral da saliva humana por meio da espectroscopia ATR-FTIR em lactentes com aleitamento materno exclusivo ou aleitamento misto = Differential sepectral signature of human saliva using ATR-FTIR epsctroscopy in exclusive breastfeeding and su [recurso eletrônico] / Fernanda Brandão de Sousa. - 2019.

Orientador: Robinson Sabino Silva.

Coorientadora: Fabiana Sodré de Oliveira.

Disserta o (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Gradua o em Odontologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1304>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustra es.

1. Odontologia. 2. Saliva. 3. Amamenta o. 4. Lactentes. I. Silva, Robinson Sabino, 1981, (Orient.). II. Oliveira, Fabiana Sodré de, 1967, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua o em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 3225-8115/8108 - [www.ppgoufu.com](http://www.ppgoufu.com) - [copod@umuarama.ufu.br](mailto:copod@umuarama.ufu.br)



Ata

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado COPOD

Data: 28/02/2019

Discente: **Fernanda Brandão de Sousa (11712ODO009)**

Título do Trabalho: *"Assinatura espectral da saliva humana por meio da espectroscopia ATR-FTIR em lactentes com aleitamento materno exclusivo ou aleitamento misto"*.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de reparo

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de reparo

As **nove horas** do dia **vinte e oito de fevereiro de 2019** no Anfiteatro Bloco 4L Anexo A, sala 23 Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro de 2019, assim composta: Professores Doutores: Danielly Cunha Araújo Ferreira de Oliveira (UFU); Leandro José Raniero (UNIVAP); e o orientador(a) do(a) candidato(a): **Robinson Sabino da Silva**

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa **Dr. Robinson Sabino da Silva** apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de argüição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a argüir o(a) candidato(a). Finalizada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada eletronicamente pela Banca Examinadora.



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2019, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Danielly Cunha Araujo Ferreira de Oliveira, Professor(a) do**



**Magistério Superior**, em 28/02/2019, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no logotipo art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Leandro José Raniero, Usuário Externo**, em 28/02/2019, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o Assinatura código verificador **1009012** e o código CRC **0F75C4A5**.

---

# DEDICATÓRIA

---

**Á Deus**, por me presentear com o dom da vida, e ser a força e sabedoria diária que me iluminou todos os dias nos meus estudos e me guiou no trajeto dos 230km da minha casa até a Universidade Federal de Uberlândia.

**Á Virgem Maria**, que me inspirou a sempre a fazer vontade de Deus, e que tantas vezes acolheu as minhas lágrimas cobrindo-me com manto celeste e colocando-me nos braços do Pai.

**Aos meus pais Milton e Maria de Fátima** que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência. Sempre me incentivaram a ir pra luta e correr atrás dos meus sonhos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu amado irmão **Fabrício** pelo apoio e incentivo de sempre.

Ao bisôvo **João dos Anjos (Paizinho)** (in memoriam) que sempre me incentivou a estudar e sempre foi muito orgulhoso de ter uma bisneta cirurgiã-dentista.

Aos **demais familiares** muito obrigado pela força e presença em minha vida

A **Pastoral Catequética** da Comunidade de São José onde pude servir durante esse tempo de dedicação ao Mestrado, que sempre me acolheu e me ajudou a manter meu foco nos planos de Deus pra minha vida.

# AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador **Prof.Dr.Robinson Sabino-Silva**, o meu reconhecimento e gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém apaixonado pela pesquisa e pela ciência. Meu respeito e admiração pela sua honestidade e ética profissional.

As estimadas, coorientadoras **Prof. Dra. Fabiana Sodré Oliveira, Prof. Dra. Alessandra de Maio Castro Prado, Prof. Dra. Danielly Cunha Araújo Ferreira de Oliveira e Prof. Dra. Ana Paula Hidalgo Turrioni**, pelos conhecimentos compartilhados e valiosa colabora o no mérito dessa produ o.

Aos **Professores do Programa de Pós gradua o** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia os quais seus ensinamentos foram essenciais e motivadores nessa etapa.

**As mães dos beb s e aos bebês**, pacientes do estágio 8 e do Projeto de Extensão em Freio Lingual que voluntariamente participaram dessa pesquisa.

As minhas queridas amigas **Fabiana Ferreira, Franciele Mendes e Cizelene Faleiros** que sempre me incentivaram a estar no caminho da docência e viram em mim potencial para tal.E aos demais mais amigos que também me apoiaram nessa trajetória obrigada pelo carinho e pelo amor.

Aos **queridos amigos do Laboratório de Fisiologia** Léia, Beatriz,Douglas,Emília.

Aos queridos **colegas** de mestrado pelo companheirismo nos momentos difíceis e de alegria , foram fundamentais nesse momento.

Ao CPBIO, coordenado pelo Prof. Carlos Soares pelo apoio e a estrutura dedicados a pesquisa.

Ao **CNPq e a FAPEMIG** pelo incentivo financeiro para o desenvolvimento da pesquisa .

**A Faculdade de Odontologia e a Universidade Federal de Uberlândia e a Faculdade de Odontologia** por toda estrutura e conhecimento fornecidos durante a realiza o da pesquisa.

# EPÍGRAFE

---

*"Deus é bom o tempo todo, o tempo todo Deus é bom!"*

Autor desconhecido



## SUMÁRIO

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS.....	07
RESUMO-PALAVRAS-CHAVES.....	08
ABSTRACT – KEY WORDS.....	09
1.INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2. PROPOSIÇÃO.....	18
3.CAPÍTULO 1.....	19
4.DISSCUSSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXOS.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART-FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com modo de reflexão total atenuada. FTIR: Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio

HTLV1 :Vírus T-Linfotrópico Humano tipo 1

HTLV2:Vírus T-Linfotrópico Humano tipo 2

NCS: Níveis de Cortisol Salivar

OMS: Organização Mundial de Saúde

QI: Quociente de Inteligência

XO: Xantina oxidase

## RESUMO

A saliva pode informar estados fisiológicos e patológicos do corpo e isto permite sua aplicação para ações clínicas de uma odontologia personalizada. Os benefícios do aleitamento materno para redução da morbidade, redução de doenças infecciosas e prevenção de baixo peso em recém-nascidos estão bem caracterizados. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a um sistema de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) é um excelente método para análises biológicas, no entanto, aplicações em determinação do estado fisiológico estão apenas começando a emergir. Ainda não foram descritas alterações na composição salivar de crianças sob amamentação exclusiva em comparação com aleitamento parcial. Desta forma, no presente trabalho foi utilizada a espectroscopia ATR-FTIR para avaliar a saliva de bebês com até quatro meses de idade sob aleitamento materno exclusivo ou sob aleitamento misto (com associação de amamentação e fórmula) buscando identificar possíveis mudanças nos componentes salivares relacionados à alimentação. Os modos vibracionais 1650  $\text{cm}^{-1}$  e 1153  $\text{cm}^{-1}$ , que identificam o alongamento com uNH (Amida I) e C-O-C (região de carboidratos livres e conjugados), foram menores ( $p < 0,05$ ) na saliva de crianças com aleitamento parcial em comparação com crianças com aleitamento materno exclusivo. Considerando que uma vibração característica de glicose (como grupo carboidrato livre) em 1030  $\text{cm}^{-1}$  permaneceu inalterada ( $p > 0,05$ ) em ambos os grupos, este trabalho demonstrou que a inserção de aleitamento misto promoveu redução da amida I e de glicoproteínas (grupos de carboidratos ligados covalentemente a diferentes proteínas) em comparação com aleitamento materno exclusivo. Este achado pode ser um importante indicativo para novas análises de proteômica e metabolômica que poderão se relacionar com alterações nas funções salivares de bebês sob diferentes formas de aleitamento.

**PALAVRA-CHAVES:** Lactente, aleitamento materno, aleitamento artificial, saliva, FTIR-ATR.

## ABSTRACT

Saliva can inform the physiological and pathological state of the body. The systemic benefits of exclusive breastfeeding in newborns are well documented, however the effect of supporting breastfeeding comparing to exclusive breastfeeding on salivary components remain unclear. Altogether, the aim of the present study was compare the salivary composition in supporting breastfed and exclusive breastfed infants using attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR). 28 mothers consented to participation of their 0-4-month old infants. 18 infants were exclusive breastfed and 10 were partially breastfed (breastfed plus formula-fed). Saliva were collected through the negative pressure apparatus e two microlitres were analyzed by ATR-FTIR. Bands  $1650\text{ cm}^{-1}$  and  $1153\text{ cm}^{-1}$  which identified the  $\nu_{\text{NH}}$  (Amide I) and C-O-C stretching (Carbohydrate groups) of supporting breastfeeding were lower ( $p < 0.05$ ) than exclusive breastfed infants. The salivary composition differs between breastfed and supporting-fed infants. Considering that a characteristic vibration of glucose (as free carbohydrate group) at  $1030\text{ cm}^{-1}$  was unchanged ( $p > 0.05$ ) in both groups, this analysis indicates reduction of amide I and glycoproteins (carbohydrate groups covalently attached to many different proteins) are reduced in SB infants which can be affect salivary functions.

**KEY WORDS:** Infant, exclusive breastfeeding, artificial feeding, saliva, FTIR-ATR.

## 1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida da criança e o aleitamento materno complementado até os dois anos de idade. A amamentação materna exclusiva é definida quando o bebê recebe apenas leite materno direto da mãe ou ordenhado por ela ou por um banco de leite, desde que a fonte seja humana, sem o consumo de outros alimentos, com exceção de remédios, dentre outros. E a amamentação materno mista ocorre quando o bebê recebe além do leite materno outros tipos de leite. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

O aleitamento materno é um investimento eficaz pois quando uma criança é amamentada gera muitas vantagens, tais como: redução da morbidade e a mortalidade infantil, melhora a pontuação do Quociente de Inteligência (QI), melhora escolar, aumenta o rendimento de adultos, evita diarreia, previne infecção respiratória, diminui o risco de alergias, reduz o risco de hipertensão e diabetes, apresenta menor custo financeiro, reduz a chance de obesidade, promove desenvolvimento da cavidade bucal, protege contra câncer de mama, promove o vínculo afetivo entre mãe e filho e, melhora qualidade de vida aspectos significativos para minimizar a pobreza e propiciar ganho nutritivo aos bebês. Adicionalmente, a divulgação da amamentação tem sido conveniente, pois em muitos países com a presença de pobreza extrema, a desnutrição tem sido um fator agravante para pessoas que vivem nesta condição (Hansen et al., 2016; Ministério da Saúde, 2009).

No entanto, por diferentes motivos algumas mães não conseguem amamentar exclusivamente com o leite materno e necessitam utilizar o complemento por meio de fórmulas. Foi descrito que mães hipertensas apresentam maior dificuldade em manter o aleitamento materno exclusivo após 6 meses quando comparadas as normotensas. As mães com hipertensão arterial gestacional apresentam maior incorporação do leite artificial como complemento e apresentaram maior periodicidade na utilização das práticas predominantes de amamentação quando comparadas as mães normotensas (Strapasson et al., 2018). Não detectamos outros estudos exclusivamente em bebês com menos de 4 meses avaliando característica maternas com maior

dificuldade em prover amamentação exclusiva, no entanto, este fato é presente na sociedade atual.

Um fator de atenção é que a possibilidade de transmissão de doenças materno-infantil pela gestação, no parto, ou por meio da amamentação. Segundo o Ministério da Saúde, são poucos os casos em que a indicação do leite materno deve ser suspensa, sendo necessário a sua substituição total ou parcial. As mães não devem amamentar nas seguintes situações: quando infectadas pelo Vírus Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus T Linfotrófico Humano tipo 1 (HTLV1) e Vírus T Linfotrófico Humano tipo 2 (HTLV2), mães que necessitam ingerir medicamentos contraindicados durante a amamentação quando a criança é portadora de galactosemia. Além disso, recomendada interrupção temporária do aleitamento materno nos casos de infecção herpética, varicela, doença de Chagas, abscesso mamário, consumo de drogas de abuso. Nos casos de interrupção temporária, a mãe deve ser estimulada a ordenhar o leite até que posteriormente possa amamentar o filho. Não é recomendado interromper a amamentação nos casos de: Tuberculose, Hanseníase, Hepatite B e Hepatite C. Apesar de seu consumo dever ser evitado durante a amamentação, o consumo de cigarros e de bebidas alcoólicas não necessita interrupção durante a amamentação, especialmente em casos de consumo reduzido (Ministério da Saúde 2009).

A amamentação pode permitir a transmissão materno-infantil do HIV) em recém-nascidos. Para o HIV foi demonstrado que a incidência de contaminação do bebê pela amamentação nos primeiros meses de vida é maior, e diminui ao longo do tempo (Miotti et al., 1999). Dessa forma, a orientação da OMS em 2003 indicava que os bebês de mães portadoras de HIV deveriam receber alimentação substituta devido ao risco de contaminação. Apesar de muitos países subdesenvolvidos adotarem medidas diferentes, no Brasil não é recomendado que mães portadoras da HIV amamentem (Ministério da Saúde 2009).

A amamentação é uma medida de saúde pública barata e eficaz. Um estudo de meta-análise demonstrou que bebês sob aleitamento materno durante pelo menos 6 meses apresentam diminuição da frequência de leucemia infantil (Amitay et al., 2015).

Normalmente crianças de 0- 6 meses não apresentam dentes na cavidade bucal o, no entanto, acredita-se que a presença do *Streptococcus mutans* nesta fase pode facilitar a formação de cáries a partir do surgimento dos dentes decíduos Em bebês com aleitamento materno ocorre um aumento da presença de *Lactobacillus* e uma redução de bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* presentes na mucosa oral em comparação com bebês sob aleitamento artificial (Holgerson et al., 2013). Além disto, outras substâncias encontradas somente no leite materno, incluindo a caseína humana e IgA secretória, podem inibir o crescimento e a adesão das bactérias cariogênicas (Danielson et al., 2009). O leite materno interage com a saliva para produzir uma potente combinação de metabólitos estimulatórios e inibitórios que regulam a microbiota oral e intestinal. Isto parece representar um sinergismo bioquímico que aumenta a imunidade inata precocemente (Al-Sherid et al., 2015).

Por ser um fluido biológico que pode ser coletado por método não invasivo, a saliva como fonte de biomarcadores de doenças bucais e sistêmicas tem sido tema de grande interesse. Entretanto, em lactentes, a saliva tem sido pouco estudada (Al-Sherid et al., 2015; Ben-Aryed et al., 1984; Holgerson et al., 2013).

A saliva não estimulada de bebês (idade entre três dias a 12 meses) apresentou concentração de  $Ca^{+}$ ,  $Mg^{++}$  e  $Cl^{-}$  aumentada e a de fosfato, IgA, amilase e pH reduzidos quando comparados com a saliva de adultos. Adicionalmente foi demonstrado que a concentração de  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  e proteínas totais da saliva de crianças sob aleitamento exclusivo foi semelhante em comparação com as que recebiam fórmulas infantis (Ben-Aryed et al., 1984). Outro estudo demonstrou diferença na microbiota bucal de bebês com três meses de idade sob aleitamento exclusivo ou sob alimentação com fórmula infantil. Entre as principais diferenças podemos destacar um aumento da presença de lactobacilos e uma redução da presença de bactérias anaeróbias, o que pode estar associado, respectivamente, a uma redução das espécies de estreptococos e uma redução da presença de inflamação gengival (Holgerson et al., 2013).

O microbioma salivar humano de bebês edêntulos com quatro meses e meio de idade foi avaliado e comparado com a saliva de suas mães

ou principais cuidadores. Os dados obtidos demonstraram que, embora o microbioma bacteriano da saliva do adulto apresentou um OTU maior, uma rica comunidade bacteriana existe na cavidade bucal infantil antes da erupção dentária (Cephas et al., 2011).

Um elegante estudo demonstrou que os níveis de IgA e IgM foram similares entre crianças sob aleitamento exclusivo em comparação com fórmula. No entanto, as mesmas crianças aos 6 meses de idade sob aleitamento materno exclusivo apresentaram aumento da IgA e IgM salivar em comparação com crianças sob aleitamento artificial exclusivo. O aumento da IgA salivar pode ser considerado um marcador de maturação imunológica e provavelmente indica maior proteção contra antígenos (Piirainen et al., 2009).

Outro estudo avaliou a influência do alojamento mãe-filho hospitalar nos níveis de cortisol salivar (NCS), que é um biomarcador responsável por indicar estresse. Para isto, o estudo comparou a saliva de crianças sob a presença materna total durante 24 h ou parcial por 14h. Os resultados mostraram que a prática de alojamento total reduz significativamente os níveis de cortisol salivar ( $p = 0,048$ ), o que leva a diminuição do estresse neonatal quando o filho tem a presença e o cuidado durante 24 h (De Bernardo et al., 2018).

Uma revisão sistemática com meta-análise mostrou que os índices de cárie foram similares em bebês amamentados sob aleitamento materno exclusivo em comparação com aleitamento artificial exclusivo. No entanto, bebês com aleitamento materno exclusivo por mais de 12 meses apresentam maiores índices de cárie em comparação com bebês que receberam aleitamento materno exclusivo por menos de 12 meses, este achado ocorre principalmente em bebês com alto índice de mamadas especialmente durante a noite sem higienização oral após a ato de amamentar (Tham et al., 2015).



Sabe-se que ocorrem alterações nas propriedades de defesa do leite materno após armazenamento ou pasteurização prolongada em bancos de leite. Os resultados mostraram que algumas proteínas presentes no leite, como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase e IgA, estão reduzidas no leite doador pasteurizado. Em relação ao crescimento de microorganismos patogênicos, houve um aumento significativo (1,8 a 4,6 vezes) no leite doador pasteurizado em relação com o leite materno fresco ou congelado (Akinbi et al., 2010).

A interação do leite materno com a saliva aumenta a imunidade na infância. No decorrer da amamentação ocorre uma reação entre o leite materno e saliva que interage com espécies reativas de oxigênio, e ao mesmo tempo favorecem a formação de nucleotídeos. Essa interação com saliva produz um poderoso metabolismo estimulante e inibitório capaz de determinar o início da microbiota intestinal pela via oral (Al-Sherid et al., 2015). Há indícios que Xantina oxidase (XO) tem atribuições fisiológicas efetivas quando está relacionada com geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Agarmal et al., 2011; Vorbach., 2003). No leite de todos os mamíferos foi realizada a detecção da XO, que é uma proteína que produz superóxido microbicida e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e atua em lactoperoxidases do leite. A presença de XO na saliva converte tiocianato dietético em espécies reativas de oxigênio que tem efeito antibacteriogênico (Al-Sherid et al., 2015).

Poucos trabalhos estudaram a atividade da lactoperoxidase no leite humano e na saliva de bebês. Nos estudos desenvolvidos por Gothefors & Marklund 1975, mostraram que a atividade de lactoperoxidase na saliva de lactentes foi inconstante, mas foi maior quando comparou com a saliva de bezerros. No entanto, a atividade da lactoperoxidase no leite humano foi menor quando comparado com o leite de vaca. O tiocianato salivar em bebês apresentou alta redução da concentração em comparação com a saliva de adultos. Estes achados indicam que a lactoperoxidase e tiocianato na saliva infantil podem estar associados ao potencial de crescimento bacteriano que pode ajustar ações clínicas de uma odontologia personalizada.

No trabalho desenvolvido por Allison et al., 2015, foi estudado o efeito do leite humano e dos componentes do *Streptococcus mutans* na formação de biofilme. A caseína aumentou e a lactose, a lactoferrina e a IgA

diminuíram consideravelmente a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*. Dessa forma, percebe-se uma ação multifatorial dos componentes salivares com interferência nutricional do leite humano e seus componentes no processo de cárie, especialmente relacionado com a formação de biofilme pelo *Streptococcus mutans*.

## **Saliva**

A saliva é produzida através das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e glândulas salivares menores espalhadas na mucosa oral (Amano et al.,2012). As glândulas salivares podem ser classificadas em serosas, mucosas ou mistas. A glândula parótida localizada na base da língua contém células serosas e secreta em alta taxa de secreção durante o estímulo parasimpático, as glândulas submandibulares localizadas abaixo da mandíbula produzem a maior parte da saliva não-estimulada e apresentam tanto células serosas quanto células mucosas. As glândulas sublinguais, localizadas na porção posterior do assoalho da boca, apresentam predomínio de células mucosas (Eliasson & Carlén , 2010).

A saliva é composta principalmente de água, substâncias orgânicas (glicose, proteínas, glicoproteínas, DNA e RNA) e inorgânicas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) ( Chiappin ,2007). Adultos produzem diariamente cerca de 500-1500 ml de saliva (Chicharro et al,1198). Sabe-se que as concentrações dos componentes orgânicos e inorgânicos da saliva podem ser afetados pelo estado fisiológico e patológico do indivíduo ( Aps & Martens 2005)

A importância da saliva na saúde bucal é bem conhecida e sua função ocorre pela sua fluidez e pelos seus componentes. A saliva é um fluido que exerce várias funções importantes para conservação da saúde bucal do indivíduo. Como exemplo do papel da fluidez pode-se destacar a umidificação do bolo alimentar e das mucosas bucais e também destacar a função da  $\alpha$ -amilase salivar no processo de digestão de carboidratos. A saliva também contribuiu para proteger injúrias mecânicas na cavidade bucal, facilita a percepção do sabor pelas papilas gustativas e permite a remineralização do esmalte dental ao estabilizar o ph oral (Amerongen & Veerman 2002). A saliva

tem um papel protetor contra atividade patogênicas, sua ação antimicrobiana reage de forma específica contra os agentes invasores impedindo sua entrada no organismo (Amerongen, Bolscher & Veerman., 2004)

A saliva tem sido bastante utilizada como fluido biológico para determinar o diagnóstico de doenças devido uma série de vantagens: coleta rápida, baixo custo, não traz desconforto ao paciente, facilidade ao armazenar, não coagula e pode refletir a condição fisiopatológica (Kaczor-Urbanowicz et al., 2016; Bossola & Tazza, 2012).

### **Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia FTIR é um método que permite a interação de radiação infravermelha com a amostra associado com um sistema de captura que permite a obtenção da composição molecular (informação química e estrutural de lipídios, carboidratos e proteínas) da amostra a ser estudada (Barh, 2007). É uma metodologia interessante para avaliação e diferenciação de amostras e fluidos biológicos (Baker et al., 2004) permitindo a análise precisas das estruturas químicas sem a utilização de reagentes (Khaustova et al., 2010).

O FTIR é uma técnica sensível para identificação de fluidos corporais das ciências forense que pode diferenciar uma amostra da outra utilizando o padrão de espectro único, que combina modos vibracionais específicos em diferentes frequência, os quais equivalem aos componentes químicos presentes na matéria biológica. Para a discriminação de cada fluido foram realizadas comparações com diversas proteínas relacionado aos picos específicos que estivessem associado aos grupos protéicos presente em cada fluido corporal (Orphanou, 2015).

Dentro os aparelhos que utilizam a Transformada de Fourier existe aqueles que contém acessório com Reflexão Total Atenuada (ATR) que tem inovado o modo de análise de amostras tanto líquidas quanto sólidas, devido ao fato desse meio de análise combater os problemas relacionados alto valor gasto no preparo da amostras e a aquisição de espectros baixa reprodutividade encontrados nos meio de análises convencionais (Souza, 2009). FTIR-ATR tem

sido alvo de bastante interesse devido a pequena profundidade de penetração e comprimento correspondente a trajetória da luz infravermelha na amostra, o que permitiu pesquisas com amostras com grande teor de água e também uma alta resolução espacial pelo refração presente no ATR ( Chan & Kazarian, 2016).

Considerando a literatura limitada sobre o efeito do aleitamento misto (materno associado com o artificial) na saliva de lactentes nesta condição comparado com lactentes sob aleitamento materno exclusivo, e devido a necessidade de realizar estudos moleculares focados em componentes peptídicos, lipídicos ou de carboidratos, nós testamos a hipótese de que o FTIR pode indicar componentes salivares diferentes na saliva de lactentes sob aleitamento misto comparado com lactentes sob aleitamento materno exclusivo.

## **2.0 PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo avaliar os componentes salivares por meio de espectroscopia FTIR lactentes entre zero a quatro meses de idade sob aleitamento misto comparado com lactentes sob aleitamento materno exclusivo.

Artigo a ser enviado para publicação no periódico: Clinical Oral Investigation

**Differential spectral signature of human saliva using ATR-FTIR spectroscopy in exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants**

BRANDAO-SOUSA .F<sup>1,2</sup>, AGUIAR, E. M. G.<sup>1,2</sup>, CARDOSO-SOUSA, L. <sup>1,2</sup>, CAIXETA,D.C<sup>1,2</sup>, OLIVEIRA SW <sup>1,2</sup>, CASTRO A.M. <sup>2</sup>FERREIRA D.C.A. <sup>2</sup>, TURRIONI A.P. <sup>2</sup>, OLIVEIRA F.S.<sup>2</sup>, SABINO-SILVA, R. <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

**\*Corresponding Author:**

Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 82 3218 2100

E-mail: [robinsonsabino@gmail.com](mailto:robinsonsabino@gmail.com)

# Differential spectral signature of human saliva using ATR-FTIR spectroscopy in exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants

## Abstract

Saliva can reflect the physiological and pathological state of the body. The systemic benefits of exclusive breastfeeding in newborns are well documented, however the effect of supporting breastfeeding comparing to exclusive breastfeeding on salivary components remain unclear. Altogether, the aim of the present study was compare the salivary composition in supporting breastfed and exclusive breastfed infants using attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR). 28 mothers consented to participation of their 0-4-month old infants. 18 infants were exclusive breastfed and 10 were partially breastfed (breastfed plus formula-fed). Saliva were collected through the negative pressure apparatus e two microlitres were analyzed by ATR-FTIR Spectroscopy. Bands  $1650\text{ cm}^{-1}$  and  $1153\text{ cm}^{-1}$  which identified the  $\nu_{\text{NH}}$  (Amide I) and C-O-C stretching (Carbohydrate groups) of supporting breastfeeding were lower ( $p < 0.05$ ) than exclusive breastfed infants. The salivary composition differs between breastfed and supporting-fed infants. Considering that a characteristic vibration of glucose (as free carbohydrate group) at  $1030\text{ cm}^{-1}$  was unchanged ( $p > 0.05$ ) in both groups, this analysis indicates reduction of amide I and glycoproteins (carbohydrate groups covalently attached to many different proteins) are reduced in supporting breastfeeding infants which can be affect salivary functions.

**KEY WORDS:** Infant, breastfeeding, artificial feeding, saliva, FTIR-ATR.

## Introduction

Considering the systemic benefits with reduction in the risk of infectious diseases in gastrointestinal tract and respiratory system, the World Health Organization (WHO) indicates exclusive breastfeeding for at least the first six months of life (WHO, 2015). The American Academy of Pediatrics attributable to exclusive breastfeeding (characterized as infant only receives breast milk without ingestion of water, formula, other liquids or solid foods) health, nutritional, immunological, psychological, social and environmental benefits (Eidelman , Schanler , and American Academy of Pediatrics .,2012). Recently, two systematic review and meta-analysis indicated that breastfeeding can protect against dental caries in early children compared with bottle fed children (Tham et al., 2015; Al-Sherid et al., 2015). The relationship between salivary composition and presence of dental caries in exclusive breastfed, supporting breastfed and formula-fed infants remain unknown.

Saliva may reflect several physiological functions of the body and this biofluid contributes in maintaining the integrity of oral tissues (Levine MJ et al., 1987). In saliva and other fluids, the biological fluids of proteins are determined by their three-dimensional structures and dynamics of proteins which can be probed by ATR-FTIR spectroscopy (Wang, 2011). Amide I vibrational mode in infrared experiments is associated with the peptide bond carbonyl stretch. This structural analysis of proteins also can reflect changes in its function (Krimm & Bandekar, 1987). The glycochemical and glycoimmunological aspects of the proteins perform primordial relations between microorganism - host, vice versa, and microorganism - microorganism (Cross & Ruhl, 2018). The reduction in salivary glycoproteins including mucins, proline-rich glycoproteins, alpha-amylases, lactoferrin, salivary peroxidase, secretory IGA, fucose-rich glycoprotein and kallikrein can affect its functions ( Levine et al., 1987).

Infrared (IR) spectroscopy is emerging as a powerful quantitative and qualitative technique for diagnostic characterization of biological molecules in fluids (Bellisola & Sorio, 2012) . The attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectrometry is a global, sensitive and highly reproducible physicochemical analytical technique that identifies structural



molecules on the basis of their IR absorption. Considering that a biomolecule is determined by its unique structure, each biomolecule will exhibit a unique ATR-FTIR spectrum, representing the vibrational mode of this structural bond (Ojeda & Dittrich, 2012; Severcan et al., 2010). The IR vibrational modes of biological samples, such as saliva, may be considered as biochemical fingerprints that correlate directly with the level of a specific component, as amide I and glycoproteins (Caetano Júnior et al., 2015; Khaustova et al., 2010).

Considering the limited literature about the effect of supporting breastfeeding (maternal associated with artificial) compared to exclusive breastfeeding on saliva of infants, and due to the need to perform molecular studies focused on peptide, lipid or carbohydrate components we tested the hypothesis that specific spectral salivary components can be differentially expressed in saliva of supporting breastfeeding compared to exclusive breastfeeding infants. Therefore, this research aimed to determine the effect of supporting breastfeeding on salivary composition by ATR-FTIR spectroscopy compared to exclusive breastfeeding infants.

## **Material and Methods**

The Institutional Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia approved the study (64534116.4.0000.5152). Infants entering the parent study between June 2017 and November 2018 were invited to participate in the current study that added salivary sampling.

Inclusion criteria were: 0–4 months old, of both sexes, healthy, edentulous, birth weight 2,500-4,500 g, full term, and exclusively breastfed or supporting breastfeeding at the time of recruitment. The exclusion criterion was chronic illness, with the presence of natal and neonatal teeth and with premature birth and birth weight below 2,500 g.

When the mothers accepted that their children participated in the research, they were invited to read and sign the Informed Consent Form that contained all the information about the research. Then, an interview was carried out to collect data such as: mother's data, child's data, type of breastfeeding and oral hygiene. Later, in the boxes of the Pediatrics Clinic, the saliva samples

were collected through the aspirator Aspiramaxm and frozen, in another moment analyzed through the FTIR.

The present study included 18 exclusive breastfeeding infants, and 10 age- and gender-matched supporting breastfeeding infants. All subjects with a negative history of systemic and oral disease. All participants received an intra oral examination with the help of a dental mirror and wooden spatula before saliva collection. No oral changes were observed found.

### ***Saliva collection***

Saliva samples were collected using slight suction through a soft plastic catheter. No intentional stimulation was used, although the presence of the soft plastic catheter might have slightly stimulated the salivary flow. Saliva was collected during around two minutes to minimize the effect of stress. During the saliva collection period, the infant remained comfortably seated on the parent's lap in a well-ventilated and well-lit room. Immediately after saliva collection, samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the analysis (Siqueira et al.,2005; Siqueira et al.,2007; Davidovich et al.,2010;Sousa et al.,2015).

Participants were requested abstain to feed 1 h before the saliva collection. A low vacuum-assisted aspiration device was utilized to obtain saliva samples from infants.

### ***Infrared spectroscopy***

Samples were analyzed in  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$  region using infrared spectroscopy with attenuated total reflection accessory (FTIR-ATR Vertex 70, Bruker Optics, Reinstetten, Germany). Two  $\mu\text{L}$  of saliva were dried on ATR Crystal, and then the saliva spectra were acquired (Nunes, Mussavira & Bindhu, 2015). Each sample and its background were recorded with 32 scans per analysis and  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution.

### ***Spectral data analysis***

FTIR spectroscopy is used to evaluate chemical fingerprints of biological samples. For this, two microliters of saliva was dried with air to obtain sample spectra. Salivary chemical profile by FTIR spectra were recorded in 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  region using FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) attached to a micro-attenuated total reflectance (ATR) accessory. All spectra were recorded at room temperature ( $23\pm 1$  °C) under similar humidity conditions. The ATR was a diamond which has a sample penetration depth ranges between 0.1 and 2  $\mu\text{m}$  in accordance with the wavelength, the refractive index of ATR-crystal material and the incidence beam angle. The infrared beam was reflected at interface toward the sample. The air spectra was considered as a background in FTIR analysis was done with clean surface in atmospheric air. Samples spectrum were taken with 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution and 32 scans were performed to each analysis. FTIR spectra were normalized and baselines were corrected using OPUS 6.5 software (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). The second derivative was obtained by applying Savitzky-Golay algorithm with polynomial order 5 and 20 points of the window. The normalization of second derivatives was made by mean, and the peak heights indicated the intensity of each salivary component.

### ***Statistical analysis***

The distributions of data were analyzed for D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Then, data were analyzed using Student t-test. The analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of  $p < 0.05$  were considered significant. Demographic, seric laboratorial data and salivary components were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## **Results**

## ***Research participants***

The results of the general characteristics of exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants were expressed in Table 1. Both groups included similar percentage of gender ( $p > 0,05$ ) and type of delivery ( $p > 0,05$ ). Besides, the mother's age and age of infants were also similar of exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding.

## ***ATR-FTIR spectra of stimulated saliva***

The infrared spectrum of whole saliva of supporting breastfeeding and exclusive breastfeeding infants is represented in Figure 1 with a superposition of several salivary components. These salivary spectra are similar under these conditions. The band area at  $1650\text{cm}^{-1}$  ( $1706\text{-}1594\text{ cm}^{-1}$ ) determines amide I. Amide II was not affected ( $p > 0.05$ ) by supporting breastfeeding. The band area at  $1551\text{ cm}^{-1}$  ( $1588\text{-}1507\text{ cm}^{-1}$ ) is identified as proteins and cortisol; which was unchanged ( $p > 0.05$ ). The bands at  $1451\text{ cm}^{-1}$  ( $1482\text{-}1439\text{ cm}^{-1}$ ) and  $1398\text{ cm}^{-1}$  ( $1436\text{-}1358\text{cm}^{-1}$ ) are identified as protein and lipids respectively. Both salivary components were unchanged ( $p > 0.05$ ) in supporting breastfeeding compared with exclusive breastfeeding infants. The bands are at  $1319\text{ cm}^{-1}$  ( $1340\text{-}1297\text{ cm}^{-1}$ ) determine amide III. The band area at  $1247\text{ cm}^{-1}$  ( $1290\text{-}1197\text{ cm}^{-1}$ ) is identified as phospholipids. The bands are at  $1153\text{ cm}^{-1}$  ( $1183\text{-}1146\text{ cm}^{-1}$ ) glycoproteins. The bands' area at  $1074\text{ cm}^{-1}$  ( $1105\text{-}1061\text{ cm}^{-1}$ ) and  $1035\text{ cm}^{-1}$  ( $1061\text{-}999\text{ cm}^{-1}$ ) are characterized as glycosylated proteins and polysaccharides, respectively. The levels of both components were unchanged ( $p > 0.05$ ) in supporting breastfeeding compared with exclusive breastfeeding infants. ATR-FTIR vibrational modes assignments of saliva are represented in Table 2.

We also carried out the second derivative of ATR-FTIR spectrum to depict vibrational modes overlapped in the raw spectra of supporting breastfeeding and exclusive breastfeeding infants saliva (Figure 3). All groups presented similar vibrational modes with subtle differences in amplitude of

second derivatives, however a vibrational mode identified as alpha-helix of Amide I at  $1650\text{ cm}^{-1}$  was reduced ( $p < 0.05$ ) in the saliva of supporting breastfeeding compared exclusive breastfeeding infants (Figure 4) The level of  $1153\text{ cm}^{-1}$  vibrational mode was also reduced ( $p < 0.05$ ) in the saliva of supporting breastfeeding and exclusive breastfeeding infants saliva. This region is attributed to a carbohydrate groups covalently attached to many different proteins (glycoproteins).

#### **4. Discussion**

Herein, we have investigated potential effect of supporting breastfeeding comparing with exclusive breastfeeding in salivary components using ATR-FTIR technology. The amplitude of two vibrational modes in second derivatives analysis were changed comparing saliva from exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants. The  $1650\text{ cm}^{-1}$  and  $1153\text{ cm}^{-1}$  vibrational modes, attributed to alpha-helix of Amide I and glycoproteins, respectively, were reduced in saliva of supporting breastfeeding compared exclusive breastfeeding infants, which suggest the effect of feeding type on salivary composition.

Whereas the salivary composition has been well-studied, there are few reports on salivary composition during human infant development, particularly in relation to feeding type and what this may affect in infants oral health. It is known that salivary composition changes comparing exclusive breastfeeding and formula feeding (Rao et al.; 2009, Sabino-Silva et al.,2013.). They were present more frequently in the oral cavity of infants who received exclusive breastfeeding when compared to infants who received the formula. Moreover, L. gasseri presented characteristics that bring benefits to the individual, which includes attachment to the human gingival epithelial cells and saliva, blocks the development of oral microorganisms and decreased the union of the cariogenic S.mutans to the saliva which indicated that infants are less prone to caries.(Vestman ,2013; Holgerson et al.,2013).,

There are few studies that show the colonization of the buccal cavity worriedly, however the colonization by the cariogenic bacterium Streptococcus

mutans was related to the increased risk of dental caries (Straetemans et al., 1998). Besides, exclusive breastfeeding infants had higher OT levels than formula feeding in plasma and saliva (Grewen et al., 2010). Furthermore, it was demonstrated that salivary cortisol was higher in breastfed infants compared with formula-fed infants. However, salivary IL-6 level was similar in both feeding type (Cao et al., 2009).

The ATR-FTIR analysis of saliva may be used in veterinary, rodent and human models. Shifts in peak positions and changes in vibrational modes intensity can be used to obtain profitable spectral data about saliva composition, which may have diagnostic potential and can indicate changes in salivary composition (Servan et al., 2010). In the present study, ATR-FTIR analysis in saliva evidenced alpha-helix of Amide I reduction. It is a common motif in the secondary structure of proteins, in which every backbone N-H group donates a hydrogen bond to the backbone C=O group of the amino acid located three or four residues earlier along the protein sequence (Deville et al., 2008). The alpha-helix of Amide I motif are frequently present in several salivary proteins as  $\alpha$ -Amylase, Albumin, Cystatins, Mucins, Proline-rich proteins and sIgA (Caetano Júnior et al., 2015). Besides, we showed that glycoproteins are reduced in saliva of supporting breastfeeding compared exclusive breastfeeding infants. Our results strongly suggest that proteomic analysis of salivary proteins could indicate changes in these parameters in supporting breastfeeding compared exclusive breastfeeding infants.

Although we have shown that ATR-FTIR technology is useful for determination of feeding type effect on salivary composition, to the best of our knowledge this is a first exploratory study using ATR-FTIR technology for this purpose. Therefore, further studies are needed to determine the applicability of this technique for identification of salivary changes in exclusive formula feeding infants. Besides, one limitation of this study is the exclusion of infants with exclusive formula feeding, which was not intentional but could be explained by advertisements for breastfeeding. Hence, the results from this explorative study should be validated in an independent cohort, and molecular mechanisms for observed salivary effects explored.

In conclusion, we showed that amplitude of two vibrational modes in second derivatives analysis of ATR-FTIR spectroscopy were changed

comparing saliva from exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants. The  $1650\text{ cm}^{-1}$  and  $1153\text{ cm}^{-1}$  vibrational modes, attributed to alpha-helix of Amide I and glycoproteins, respectively, were reduced in saliva of supporting breastfeeding compared exclusive breastfeeding infants, which suggest the effect of feeding type on salivary composition. The finding that the salivary component differs between breastfed and supporting-fed infants, with a potentially less relevant salivary proteins/glycoproteins in supporting-fed infants indicates the value of prospective longitudinal studies where oral health outcomes, primarily early childhood caries but possibly also gastric/gut function and associated oral health conditions, are evaluated.

### **Acknowledgements**

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014), FAPEMIG (#APQ-02872-16) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). We would like to thank our collaborators at the Dental Research Center in Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology (CPbio).

### **Contributions**

F.B.S collected, analyzed and interpreted the data, conceived the research hypothesis and wrote the manuscript. E.M.G.A, L.C.S ,D.C.C and S.W.O assisted with research assays and data collection. F.S.O., A.M.C, A.P.T, D.C.A.F,and W.L.S were involved in conceiving the study, data analysis and interpretation, as well as reviewing and editing all parts of the final document for publication. R.S.S. was involved in conceiving and designing the study, conceived the research hypothesis, reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Competing Interests**

The authors declare that they have no competing interests

## References

Andrew Chan KL and Kazarian SG. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chemical Society Reviews**. 2016 Apr 7;45(7):1850-64.

<https://doi.org/10.1039/C5CS00515A>

Agarwal A, Banerjee A, Banerjee UC. Xanthine oxidoreductase: a shift from the purine metabolism to the cardiovascular excitation-contraction coupling. **Crit Rev Biotechnol**. 2011;31: 264-280.

<https://doi.org/10.3109/07388551.2010.527823>

Akinbi H, Meinzen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. 2010;51(3):347-52

<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181e07f0a>

Al-Shehri SS, Knox CL, Liley HG, Cowley DM, Wright JR, Henman MG et al. Breastmilk-saliva interactions boost innate immunity by regulating the oral microbiome in early infancy. **PLOS ONE**. 2015;1: 1 -19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135047>

Allison LM, Walker LA, Sanders BJ, Yang Z, Eckert G, Gregory RL. Effect of Human Milk and its Components on Streptococcus Mutans Biofilm Formation. **J Clin Pediatr Dent**. 2015;39(3):255-61.

<https://doi.org/10.17796/1053-4628-39.3.255>

Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: An overview of the Japan Salivary Gland Society – sponsored workshop. **Acta Histochem Cytochem**. 2012;45:241–250.

<https://doi.org/10.1267/ahc.12013>

Amerongen AV, Veerman EC. The defender of the oral cavity. **Oral Dis**. 2002;8 (1): 12-22.

<https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.10816.x>

Amerongen AVN, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: value of protection and diagnosis in karyology? **Caries Res**. 2004;38 (3): 247-53.

<https://doi.org/10.1159/000077762>

Amitay EL, Keinan-Boker L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. **JAMA Pediatr**. 2015; 169 (6): e151025

<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.1025>

Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Sci Int**. 2005 Jun 10;150(2-3):119-31.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>



Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**.2007; 1767(9):1073-101.ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002.

Baker MJ et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc**. 2014;9 (8):1771-91,ISSN 1750-2799. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

Bellisola G ,Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. **Am J Cancer Res**. 2012; 2(1): 1–21.

Ben-Aryed H, Lapid S, Szaregel R, Benderly A, Gutman D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. **Arch Oral Biol**. 1984;29(5):357-62. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(84\)90160-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(84)90160-2)

Bossola M, Tazza L. Xerostomia in patients on chronic hemodialysis. **Nat Rev Nephrol**. 2012; 8 (3): 176-82. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.218>

Blumental S, Ferster A, Van den Wijngaert S, Lepage P. HIV transmission through breastfeeding: still possible in developed countries. **Pediatrics**.2014;134(3):e875-9. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3022>.

Cao Y,Rao SD, Phillips TM, Umbach DM, Bernbaum JC, Archer JI et al. Are breast-fed infants more resilient? Feeding method and cortisol in infants. **J Pediatr**. 2009;154(3):452-4. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.09.025>

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** 31. 2015;31:116-124. I: <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>

Cephas KD, Kim J, Mathai RA, Barry KA, Dowd SE, et al.Comparative Analysis of Salivary Bacterial Microbiome Diversity in Edentulous Infants and Their Mothers or Primary Care Givers Using Pyrosequencing. **PLoS ONE**. 2011;6(8): e23503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023503>

Chiappin S , Giorgia A, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. **Clin Chim Acta**. 2007; 383 (1-2): 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>

Chicharro JL, Lúcia A , Perez M, Vaquero AF , Urena R. Saliva composition and exercise. **Sports Med**. 1998; 26 (1): 17-27. <https://doi.org/10.2165/00007256-199826010-00002>

Cross BW ,Ruhl S.Glycan recognition at the saliva - oral microbiome interface. **Cell Immunol**. 2018;333:19-33 . <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.08.008>

Danielsson Niem L, Hernell O, Johansson I. Human Milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro. *Caries Res* 2009; 43: 171-8. <https://doi.org/10.1159/000213888>.

Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J & Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2010; 20: 235–241 <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2010.01045.x>

De Bernardo G, Riccitelli M, Giordano M, Proietti F, Sordino D, Longini M et al. Rooming-in Reduces Salivary Cortisol Level of Newborn. *Mediators Inflamm.* 2018;8. <https://doi.org/10.1155/2018/2845352>

Deville J, Rey J, Chabbert M. Comprehensive analysis of the helix-X-helix motif in soluble proteins. *Proteins*. 2008;72(1):115-35 <https://doi.org/10.1002/prot.21879>

Eidelman AI, Schanler RJ, and American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012; 129: e827–e841. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>

Eliasson L, Carlén A. An update on minor salivary gland secretions. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:435–442. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00766.x>

Feldens CA, Ardenghi TM, Cruz LN, Scalco G, Vitolo MR. Advising mothers about breastfeeding and weaning reduced pacifier use in the first year of life: a randomized trial. *Community Dent Oral Epidemiol* 2013; 41: 317–326. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12030>

Gothefors L, Marklund S. Lactoperoxidase Activity in Human Milk and in Saliva of Newborn Infants. *Infect Immun.* 1975;11(6):1210-1215.

Grewen KM, Davenport RE, Light KC. An investigation of plasma and salivary oxytocin responses in breast- and formula-feeding mothers of infants. *Psychophysiology*. 2010;1;47(4):625-32 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2009.00968.x>

Hansen K. Breastfeeding: a smart investment in people and in economies. *Lancet*. 2016;30;387(10017):416. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00012-X)

Haukioja A, Ihalin R, Loimaranta V, Lenander M, Tenovuo J. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to an innate defence mechanism, the lactoperoxidase system, in buffer and in human whole saliva. *Journal of Medical Microbiology* 2004;53, 855–860. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45548-0>

Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Öhman C, Domellöf M, Tanner ACR et al. Oral Microbial Profile Discriminates Breastfed from Formula-Fed Infants. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 2013; 56(2): 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0854-1>

Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **The Analyst** 135.2010;3183-3192.. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>

Kaczor-Urbanowicz KE , Martin Carreras-Presas C , Aro K , M Tu , Garcia-Godoy F , Wong DT . Saliva diagnostics - Current views and directions. **Exp Biol Med (Maywood)**\_2017; 242 (5): 459-472. <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>

Krimm S , Bandekar J .Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins.**Adv Protein Chem.** 1986; 38: 181-364. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60528-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60528-8)

Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC et al. Structural aspects of salivary glycoproteins. **J Dent Res**\_ 1987;66(2):436-41. <https://doi.org/10.1177/00220345870660020901>

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

Miotti PG, Taha TE, Kumwenda NI, Broadhead R, Mtimavalye LA, Van der Hoeven L et al. HIV transmission through breastfeeding: a study in Malawi. **JAMA.** 1999;25;282(8):744-9. <https://doi.org/10.1001/jama.282.8.744>

Ministério da Saúde. SAÚDE DA CRIANÇA: Nutrição Infantil Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. Brasília – DF 2009 Caderno de Atenção Básica, nº 23.

Ministerio da Saúde . SAÚDE DA CRIANÇA: CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO Cadernos de Atenção Básica, nº 33 Brasília – DF 2012.[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_crianca\\_crescimento\\_desenvolvimento.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_crescimento_desenvolvimento.pdf)

Morzel M, Jeannin A, Lucchi G, Truntzer C, Pecquer D, Nicklaus S, et al. Human saliva peptidoma is modified with age and diet transition. **Proteomics** 2012; 75(12):3665-73. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.028>

Movasaghi Z, Rehman S & Rehman UI. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Journal Applied Spectroscopy Review.**2007;42. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>

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* .2015;25, 177-192.

<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** (Clifton, N.J.) 2012; 881:187-211.

[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8)

Orphanou CM. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. **Forensic Science International** . 2015; 252:e10–e16.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.020>

Petibois C, Rigalleau V, Melin AM, Perromat A, Cazorla G, Gin H, Déléris G. Determination of Glucose in Dried Serum Samples by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. **Clinical Chemistry** .1999, 45 (9) 1530-1535.

Piirainen L, Pesola J, Pesola I, Komulainen J, Vaarala O. Breastfeeding stimulates total and cows milk-specific salivary IgA in infants.

**Pediatr Allergy Immunol** 2009;20:295–298.

[doi.org/10.1111/j.1399-3038.2008.00776.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2008.00776.x)

Rao, P. V. *et al.* Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *Journal of proteome research*.2009; 8: 239-245.

<https://doi.org/10.1021/pr8003776>

Reed SG, Cunningham JE, Latham TN, Shirer SC and Wagner CL. Maternal Oral Mutans Streptococci (MS) Status, Not Breastfeeding, Predicts Pre-eruptive Infant Oral MS Status. **Breastfeed Med**. 2014 Nov 1; 9(9): 446–449

<https://doi.org/10.1089/bfm.2014.0036>

Sabino-Silva R. *et al.* Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats.

**Diabetology&MetabolicSyndrome**.2013;5(64).Disponível em:

<<http://www.dmsjournal.com/content/pdf/1758-5996-5-64.pdf>> Acesso em 11 Nov. 2015.

Salone LR, Vann Jr WF, Dee DL. Breastfeeding An overview of oral and general health benefits. **Elsivier**. 2013; 144(2), 143-151.

<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0093>

Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R. & Gorgulu, G. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. **Journal of biophotonics**. 2010;3: 621-631.

<https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>

Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. **Clin Oral Invest** .2005;9:26–29.

<https://doi.org/10.1007/s00784-004-0282-3>

Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. **Spec Care Dentist.** 27(5): 202-5, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.2007.tb00347.x>

Sousa MC, Vieira RB, Santos DS, Carvalho CAT, Camargo SEA, Mancini MNG. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. **Archives of oral biology.** 2015;60:600-605. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.013>

Souza RM. ATR: Avanço da espectroscopia de infravermelho na análise de materiais plásticos. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens. 2009;21(3):1-3. [http://www.cetea.ital.org.br/informativo/v21n3/v21n3\\_artigo1.pdf](http://www.cetea.ital.org.br/informativo/v21n3/v21n3_artigo1.pdf)

Straetemans MM, Loveren CV, de Soet JJ, et al. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. **J Dent Res.** 1998;77:1851-5. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0087-6>

Strapasson MR, Ferreira CF, Ramos JGL. Associations between postpartum depression and hypertensive disorders of pregnancy. **Int J Gynaecol Obstet.** 2018;143(3):367-373. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12665>

Tham R, Bowatte G, Dharmage SC, Tan DJ, Lau MXZ, Dai X. Breastfeeding and the risk of dental caries: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatrica.** 2015;62-84 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142922>

The World Health Organisation. HIV and infant feeding—guidelines for decision makers. Geneva: The World Health Organisation; 2003.

Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressler CA, Claesson R, Domellöf M et al. Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. **BMC Microbiol.** 2013;15(13):193 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-193>

Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. **Trends Immunol.** 2003; 24: 512-517. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00237-0)

Wang L, Middleton CT, Zanni MT, Skinner JL. Development and validation of transferable amide I vibrational frequency maps for peptides. **J Phys Chem B.** 2011 Apr 7;115(13):3713-24. <https://doi.org/10.1021/jp200745r>

World Health Organization. Infant and young child feeding. Fact Sheet No 342. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/en/Fexclusivebreastfeedingruary2004>. (accessed on 30th July 2016).

World Health Organization (WHO). 10 Facts on Breastfeeding. *WHO* [Internet]. [cited September 2016] Available in: <http://www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/en/> (2015).

## Tables

**Table 1.** Characteristics of infants 0 to 4 months of age by type of breastfeeding

	Exclusive Breasfeeding	Supporting Breasfeeding
Female	8	3
Male	10	7
Vaginal delivery	7	4
Cessionary	11	6
Mother's age	Average: 26,61 years	30,1years
Oral hygiene from birth	7 Yes 11 NO	5 Yes 5 No
Age (days)	44,3	54,1

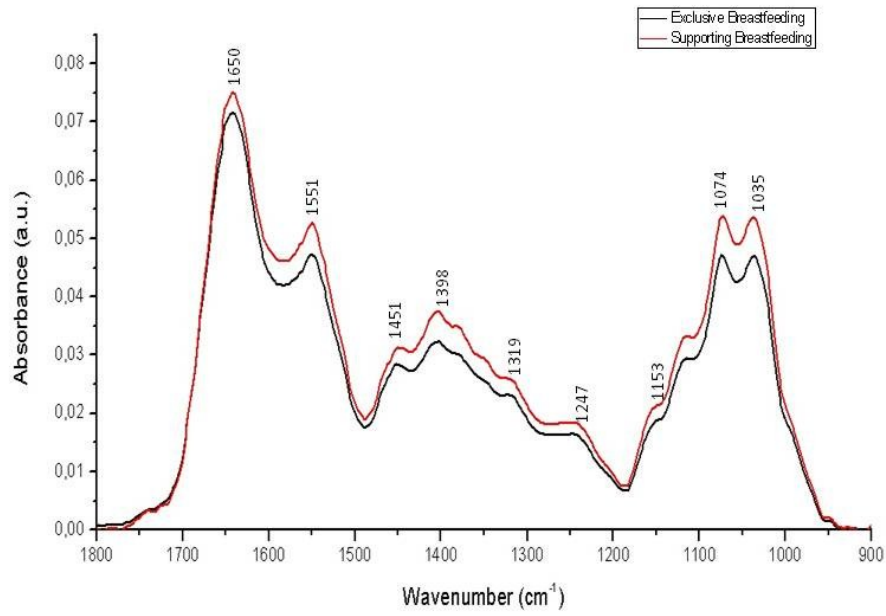
**Table 02.** ATR-FTIR peak component identification of saliva

Peak Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Proposed Component Identification	Vibrational Mode
1650	Amide I	C=O stretching
1551	Amide II	N-H bending symmetric, COO- stretch symmetric
1451	Proteins and cortisol	Asymmetric & symmetric CH <sub>2</sub> bending
1398	Protein and lipids	CH <sub>3</sub> bending symmetric, COO-stretch symmetric
1319	Amide III band components of proteins	
1247	phospholipids	Asymmetric C—N stretching, PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> stretching
1153	GLYCOPROTEINS	C-O stretching vibration)
1074	amide III and phospholipids	CH <sub>2</sub> OH groups, C-O stretching & COH groups bending, symmetric PO <sup>2-</sup> stretching
1035	GLUCOSE	C-O stretching

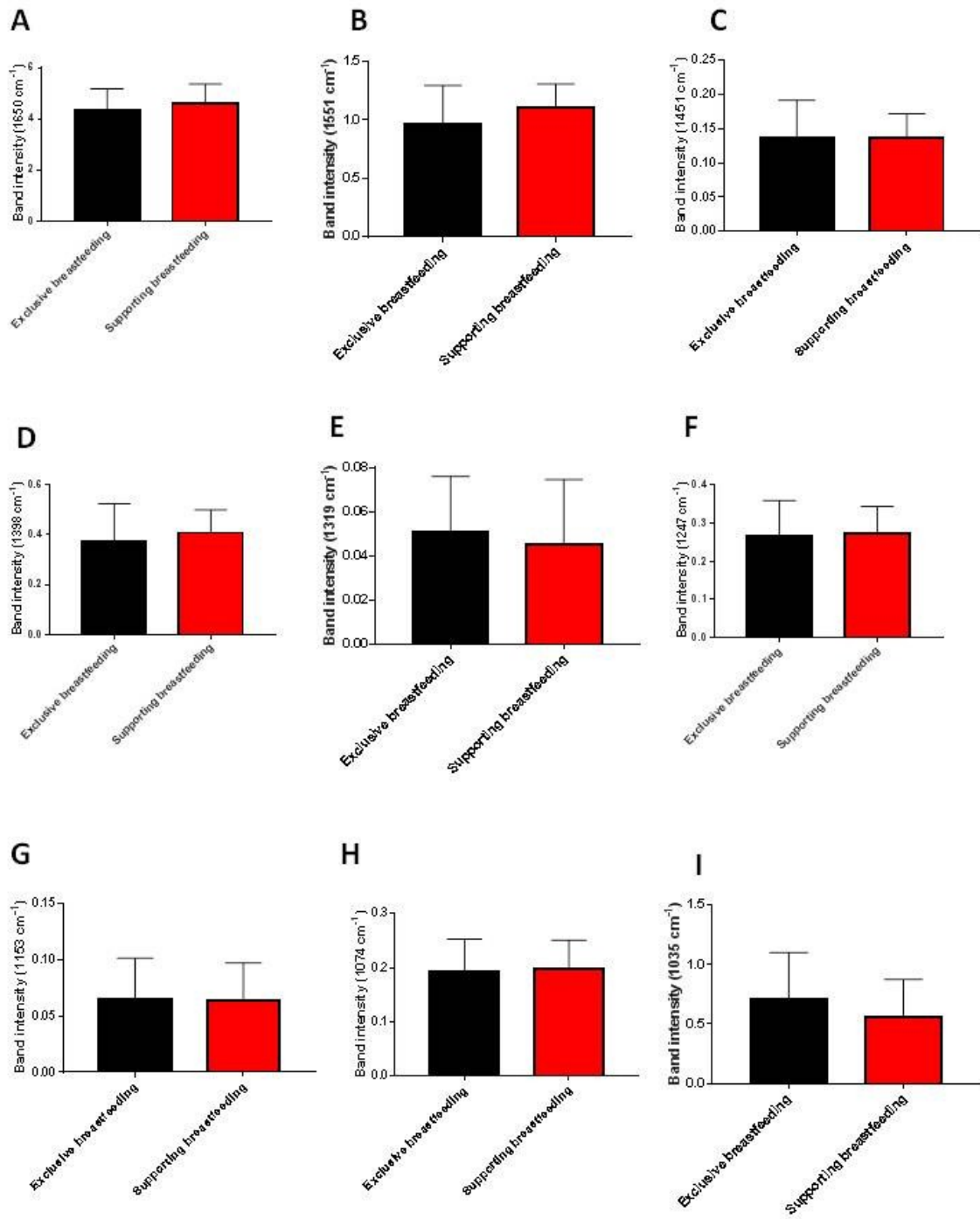
It used the following functions of vibrational attribution: (Caetano Júnior et al., 2015), (Movasaghi et al., 2007) (Orphanou, 2015) (Lopes et al., 2016) (Petibois et al., 1999)



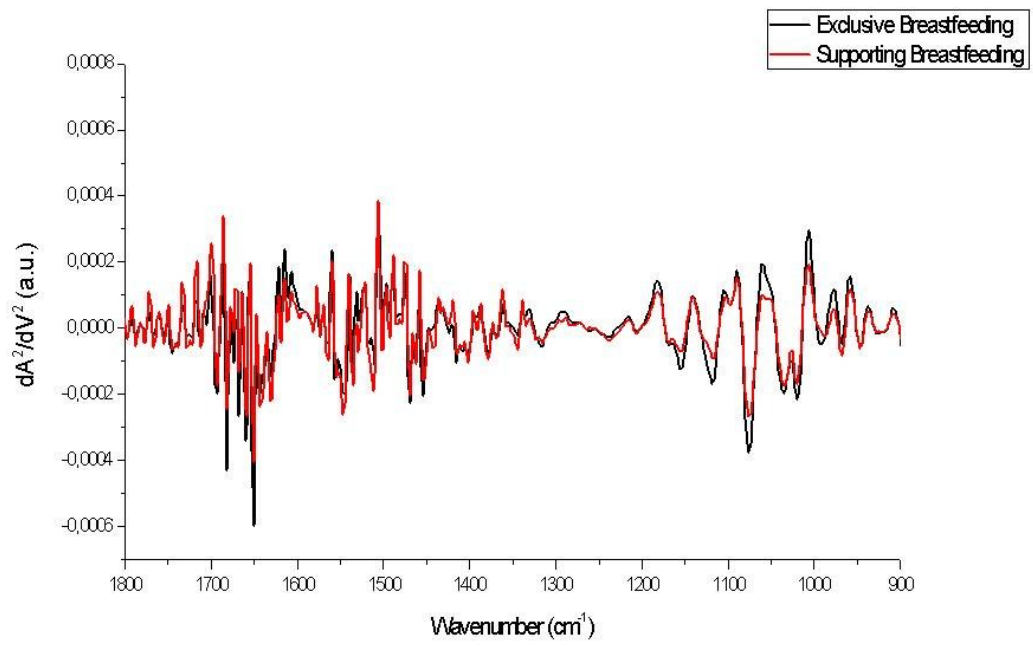
## Figures



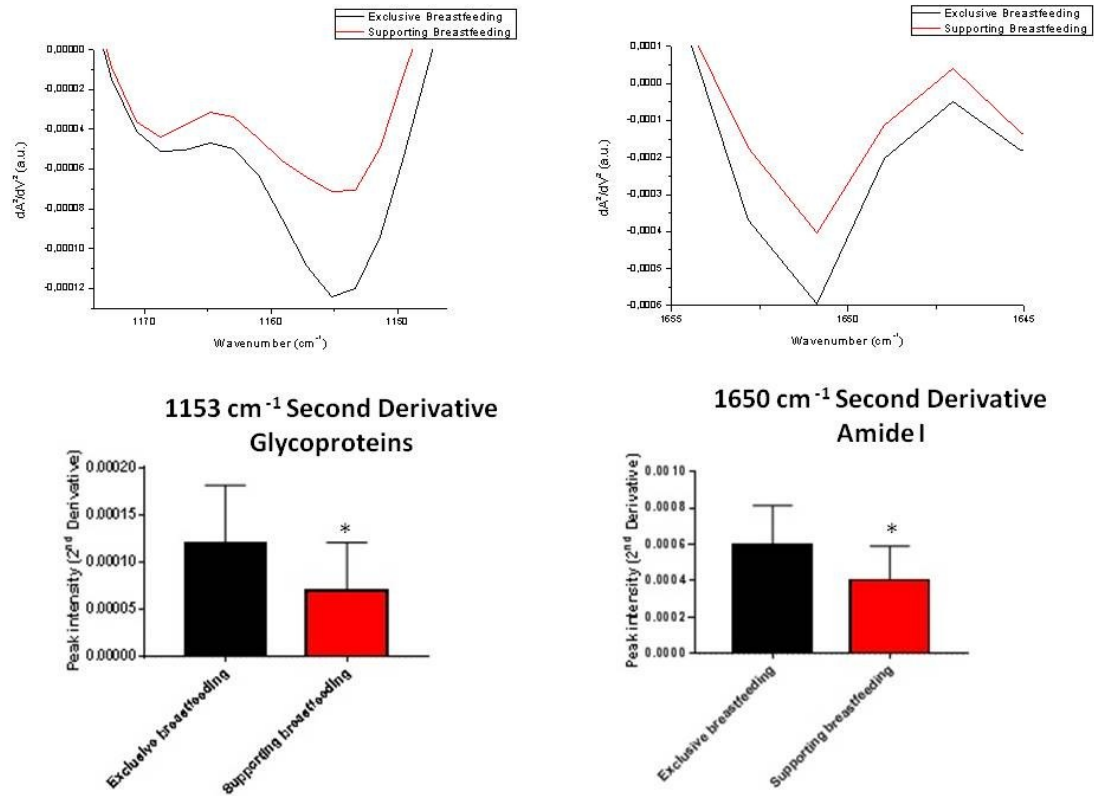
**Figure 1:** Comparison of the average FTIR spectrum in exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants.



**Figure 2** : Level of salivary components. A- amide I, B- amide II, C- protein, D- protein, E- amide III, F- phospholipids, G- Glycoproteins, H- amide III, I- glucose. Results are mean  $\pm$  SD. Unpaired t test. n=18 for exclusive breastfeeding, n=10 for supporting breastfeeding.



**Figure 03** : Comparison of the second-derivative spectra average by ATR-FTIR.



**Figure 04:** Analysis of vibrational modes at 1650 cm<sup>-1</sup> and 1153 cm<sup>-1</sup> in exclusive breastfeeding and supporting breastfeeding infants. \*p<0.05 vs. exclusive breastfeeding. Unpaired t test. n=18 for exclusive breastfeeding, n=10 for supporting breastfeeding.

