UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

DIAGNÓSTICO DA COVID-19 EM SORO HUMANO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, novembro de 2020

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

DIAGNÓSTICO DA COVID-19 EM SORO HUMANO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Co-orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior

São José dos Campos, novembro de 2020

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ALUNA: ANA CRISTINA CASTRO GOULART

DIAGNÓSTICO DA COVID-19 EM SORO HUMANO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Flávio Aimbire Soares de Carvalho

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof(a). Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, novembro de 2020

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

Possui graduação em Ciências Biológicas - Modalidade médica (Biomedicina) pela Universidade de Mogi das Cruzes (2000), pós graduação lato sensu em Hematologia e Hemoterapia pela Academia de Ciências e Tecnologia curso chancelado pela Universidade estadual Paulista (Unesp) e pós graduação lato sensu em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes. Grande experiência em laboratório clínico e área de qualidade analítica. Atualmente atua como biomédica responsável pela Hematologia da prefeitura de Jacareí.

694d Goulart, Ana Cristina Castro

Diagnóstico da covid-19 em soro humano usando espectroscopia raman / Ana Cristina Castro Goulart. - 2020.

52f. : il.; 30cm.

Orientador: Renato Amaro Zângaro.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, , 2020.

Bibliografia: f.46-52

1. Engenharia biomédica. 2. Espectroscopia Raman. 3. SARS-CoV 2. 4. COVID-19. 5. Análise dos componentes principais .

CDD 610.28

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

À minha família, pilar máximo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edmundo e Imaculada (in memorian) que, como muitos brasileiros, vieram de uma cidade pequena tentando a vida em São Paulo e com dignidade e muito trabalho puderam me proporcionar a oportunidade de estudar.

A meu marido Rafael, que caminha pela vida comigo há tanto tempo, que participou das minhas alegrias e tristezas e que, ao nos escolhermos, construímos juntos uma família que é tudo de mais importante em minha vida. Que nossas escolhas sejam sempre pela felicidade coletiva.

Aos meus filhos Gabriel e André, por darem um colorido especial à minha vida, por entenderem as inúmeras vezes que me ausentei para ficar estudando. Ao Gabriel que tornou possível a entrega de várias tarefas de exatas e que frequentemente vinha fazer massagem nos meus ombros e ao André que por vezes me tirava do computador me dando beijinhos e me levando para fazer bolos. Não há palavras para expressar o meu amor por vocês!

Aos meus sogros Lise e Rafael e cunhados Diego e Lola sou imensamente grata por fazer parte dessa família que amo tanto.

Ao meu orientador Renato Amaro Zângaro agradeço a confiança, os ensinamentos, as inúmeras correções e às conversas de diversos assuntos que sempre rendiam reflexão.

Ao meu co-orientador, Landulfo Silveira Júnior agradeço pelos ensinamentos, por sua maneira prática e com rigor na condução do artigo. O senhor transparece o amor pelo seu trabalho.

Ao diretor do laboratório municipal de Jacareí, Silvano de Carvalho que me concedeu o tempo para participar do curso. À equipe do laboratório especialmente da Hematologia, Deusa e Andreza. Um agradecimento especial ao biomédico Adriano que além de me estimular a fazer mestrado também supriu tantas vezes a minha ausência.

A todos os professores da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, meus sinceros agradecimentos, aprendi muito com vocês. A secretária Nídia sempre nos ajudando e orientando além de adoçar nossos dias com suas palhas maravilhosas.

Financiadores:

Ana Goulart agradece a Universidade Anhembi Morumbi pela concessão da bolsa de estudos.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais.”

Rubem Alves

RESUMO

Em dezembro de 2019 foram relatados os primeiros casos da COVID-19 em Wuhan, China, essa doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 se alastrou rapidamente pelo mundo representando uma ameaça global à saúde pública e economia. Este estudo preliminar propõe o diagnóstico da COVID-19 por meio da espectroscopia Raman. Foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 10 indivíduos positivos e 10 indivíduos negativos para COVID-19 por RNA de RT-PCR e testes de ELISA. Os espectros Raman foram obtidos a partir de um espectrômetro Raman dispersivo (830 nm, 350 mW) em triplicata, sendo submetidos à análise exploratória com análise de componentes principais (PCA) para identificação das diferenças espectrais e análise discriminante com PCA (PCA-DA) e mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para classificação dos espectros de soro sanguíneo em amostras negativas (Controle) e positivas para COVID-19. Os espectros de ambos os grupos mostraram picos referentes à constituição basal do soro (principalmente albumina). Os espectros de diferença mostraram diminuição nos picos referentes a proteínas e aminoácidos para o grupo positivo. As variáveis do PCA apresentaram diferenças espectrais mais detalhadas relacionadas às alterações bioquímicas decorrentes do COVID-19, como aumento de lipídios, compostos nitrogenados (ureia e aminas / amidas) e ácidos nucléicos e diminuição de proteínas e aminoácidos (triptofano) no grupo COVID -19. A análise discriminante aplicada às cargas de componentes principais (PC 2, PC 4, PC 5 e PC 6) podem classificar os espectros com 87% de sensibilidade e 100% de especificidade em comparação com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade indicados na bula do kit RT-PCR , demonstrando as possibilidades de uma técnica rápida e sem uso de reagentes para o diagnóstico de infecção por COVID-19.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica. Espectroscopia Raman. SARS-CoV-2. COVID-19. Análise discriminante. Análise do componente principal. PCA.

ABSTRACT

In December 2019 the first cases of COVID-19 were reported in Wuhan, Chin, this disease caused by the SARS-CoV-2 virus spread rapidly around the world, representing a global threat to health and the economy. This preliminary study proposed the diagnosis of COVID-19 by means of Raman spectroscopy. Samples of blood serum from 10 individuals positive and 10 individuals negative for COVID-19 by RT-PCR RNA and ELISA tests were analyzed. Raman spectra were obtained with a dispersive Raman spectrometer (830 nm, 350 mW) in triplicate, being submitted to exploratory analysis with principal component analysis (PCA) to identify the spectral differences and discriminant analysis with PCA (PCA-DA) and partial least squares (PLS-DA) for classification of the blood serum spectra into Control and COVID-19. Raman spectra were obtained from a dispersive Raman spectrometer (830 nm, 350 mW) in triplicate, being submitted to exploratory analysis with principal component analysis (PCA) to identify the spectral differences and discriminant analysis with PCA (PCA-DA) and partial least squares (PLS-DA) for classification of blood serum spectra in negative (Control) and positive samples for COVID-19.The spectra of both groups showed peaks referred to the basal constitution of the serum (mainly albumin). The difference spectra showed decrease in the peaks referred to proteins and amino acids for the group positive. PCA variables showed more detailed spectral differences related to the biochemical alterations due to the COVID-19 such as increase in lipids, nitrogen compounds (urea and amines/amides) and nucleic acids, and decrease of proteins and amino acids (tryptophan) in the COVID-19 group. The discriminant analysis applied to the principal component loadings (PC 2, PC 4, PC 5 and PC 6) could classify spectra with 87% sensitivity and 100% specificity compared to 95% sensitivity and 100% specificity indicated in the RT-PCR kit leaflet, demonstrating the possibilities of a rapid, label-free and costless technique for diagnosing COVID-19 infection.

Keywords: Biomedical Engineering. Raman spectroscopy. SARS-CoV-2. COVID-19. Discriminant analysis. Principal component analysis. PCA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

1.1 Objetivos gerais **19**

1.2 Objetivos específicos **19**

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **19**

2.1 Coronavírus **19**

2.2 Estrutura do SARS-CoV-2 **20**

2.2.1 Mecanismo de ação do vírus e patogênese **21**

2.2.2 Transmissão e manifestações clínicas da COVID-19 **23**

2.2.3 Métodos laboratoriais de diagnóstico da COVID 19 **24**

2.3 Espectroscopia Raman **25**

2.3.1 Aplicações da espectroscopia Raman em materiais biológicos **27**

2.3.2 Aplicações da espectroscopia Raman no diagnóstico de vírus **27**

2.4 Ferramentas estatísticas para análise dos espectros **28**

2.4.1 Análise por componentes principais (PCA) **28**

2.4.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS e PCA) **29**

3 MATERIAIS E MÉTODOS **29**

3.1 Parecer ético **29**

3.2 Amostras biológicas **30**

3.3 Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento **31**

3.4 Análises exploratória e discriminante **33**

3.4.1 Classificação de componentes principais (PCA) **33**

3.4.2 Análise discriminante baseada em PLS e PCA **34**

4 RESULTADOS **35**

4.1 Comparativo entre metodologias convencionais **35**

4.2 Espectros Raman de amostras de soro de Controle e COVID-19. **35**

4.3 Análise exploratória por PCA e significância segundo *t* de Student **38**

4.4 Análise discriminante e modelos de classificação PLS-DA e PCA-DA **41**

5 DISCUSSÃO **42**

5.1 Principais evidências espectrais e sua correlação bioquímica **42**

5.2 Perspectivas futuras **44**

6 CONCLUSÃO **45**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Painel global de casos da COVID-19 por milhão de habitantes **17**

Figura 2: Painel de casos da COVID-19 por milhão de habitantes – Brasil **18**

Figura 3: Mortalidade global por região da COVID-19. **19**

Figura 4: Estrutura do coronavírus **21**

Figura 5: Estrutura do SARS-Cov2 e mecanismo de entrada na célula **22**

Figura 6: Esquema da transição entre os níveis de energia molecular e suas bandas Raman correspondente. **26**

Figura 7: Sítio de coleta de secreção para pesquisa da COVID-19: nasofaringe e orofaringe **30**

Figura 8-A: Esquema do espectrômetro Raman dispersivo modelo Dimension P-1 **32**
Figura 8-B :Aparelho Raman dispersivo **32**

Figura 9: Média dos espectros Raman do soro sanguíneo do grupo Controle e de pacientes com COVID-19 diagnosticado por RT-PCR **36**

Figura 10: Gráfico das primeiras 6 variáveis de componentes principais escores e PCs. **40**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Agrupamento bioquímico por posição dos picos e atribuição segundo a Literatura **36**

Tabela 2: Sensibilidade, especificidade e porcentagem de classificação correta (acurácia), para a classificação de COVID-19 versus soros de controle pelas discriminações: LDA, PCA-DA e PLS-DA **41**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID 19:

Corona Virus Disease 19

Doença do Coronavírus 19

SARS CoV-2

Severe acute respiratory syndrome Coronavirus

Síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2

OMS

Organização Mundial da Saúde

MERS-CoV

Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

Síndrome Respiratória do Oriente Médio de Coronavírus

RNA

Ribonucleic Acid

Ácido Ribonucleico

ER

Espectroscopia Raman

PCA

Principal component analysis

Análise dos Componentes Principais

RT - PCR

Reverse transcription – polymerase chain reaction

Trasncrição Reversa - Reação de Cadeia de Polimerase

µL

Microlitros

PROTEÍNA S

Proteína SPIKE

HR1

Heptad Repeat1

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FT-IR: Infrared With Fourier transform

Infravermelho com Transformada de Fourier

IgA, IgM, IgG

Imunoglobulina A,M,G

PCR

Proteína C Reativa

SERS

Surface enhanced Raman spectroscopy

Espectroscopia Raman amplificada por superfície

TERS

Tip-enhanced Raman spectroscopy

Espectroscopia Raman com ponta aprimorada

INTRODUÇÃO

A COVID-19 (doença do coronavírus 2019) é causada pelo vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2) surgiu em dezembro de 2019 na China e se alastrou pelo mundo causando perdas de vida e efeitos econômicos negativos nos setores primários, secundários e terciários (NICOLA M, ALSAFI Z, SOHRABI C, et.al.2020) .

Em 30 de janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como emergência de saúde pública de preocupação internacional e em 11 de março declarou a doença como pandemia (OMS).

A transmissibilidade do vírus é determinada por sua circulação na população e depende da suscetibilidade (imunidade do indivíduo frente ao vírus) resultando em diferentes taxas de contágio. Alguns estudos indicaram que na Espanha 5% da população não era suscetível ao vírus, ou seja, foram infectadas e ficaram imunizadas sem apresentar sintomas, no Brasil, um estudo realizado em junho de 2020 em 133 cidades, apresentou uma taxa de 3,8% de indivíduos não suscetíveis. A relação entre transmissibilidade e suscetibilidade, remete a ideia de imunidade de rebanho, sendo que, por meio de cálculos pode-se estimar quantos indivíduos devem ser imunizados para que não atinja a população vulnerável, o mesmo princípio se aplica à vacina que tem por objetivo imunizar e interromper a transmissibilidade (OMS).

Na ausência de vacina, várias intervenções não farmacológicas foram implementadas pelos governos a fim de reduzir a taxa de contágio na população como: fechamento de escolas, comércios e serviços não essenciais, distanciamento social, uso de máscara, testagem em massa além do fechamento das fronteiras terrestre e restrição do tráfego aéreo (NETO et.al, SCHUCHMANN et.al , FERGUSON et.al. CHU et.al 2020).

A fim de causar menos impacto social e econômico, alguns países como Reino Unido e Holanda começaram com isolamento vertical ou mitigação que tem como objetivo diminuir a propagação da doença protegendo indivíduos mais suscetíveis e expondo aqueles com sistema imune mais resistente ou menos vulneráveis, porém com o aumento no número de casos, adotou o isolamento horizontal ou supressão que visa reduzir definitivamente o número de casos, porém

com maior impacto econômico e social (SCHUCHMANN et.al , FERGUSON et.al.2020).

A Itália e a Espanha demoraram muito para determinar o isolamento social horizontal e tiveram grande número de casos e mortes. A supressão foi adotada com sucesso na China e na Coréia do Sul (SCHUCHMANN et.al , FERGUSON et.al.2020). No Brasil, uma mistura de mitigação, supressão e bloqueio, tem sido adotada pela maioria dos governadores de estados e prefeitos de cidades e mesmo adotando essas medidas o número de casos (24.928,43 por milhão de habitantes) e mortes (731,1 por milhão de habitantes) foi de extrema relevância, colocando o país na segunda posição mundial em número de mortos (Figuras1,2,3). (GARCIA et.al., THUNSTROM et.al.MARSON et.al.2020).

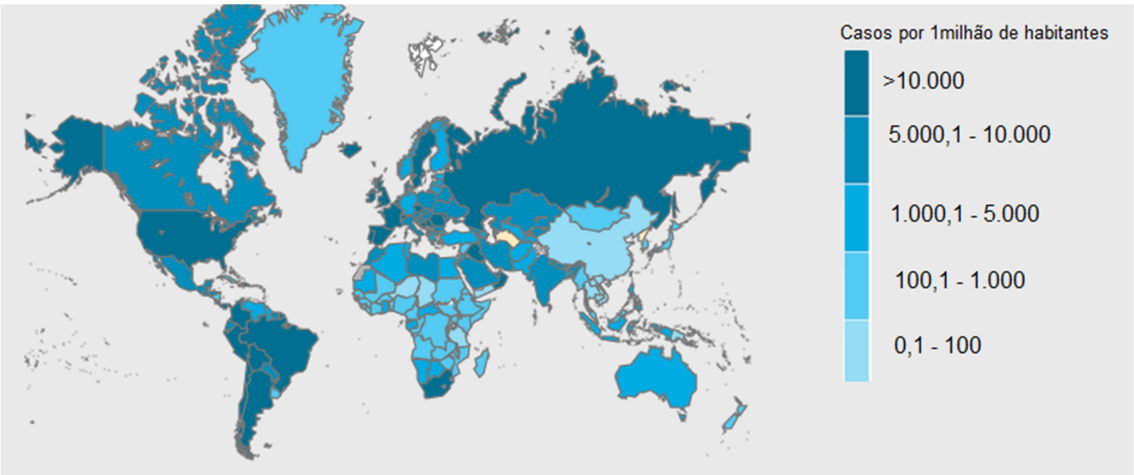

Figura 1: Painel global de casos da COVID-19 por milhão de habitantes

Fonte: Organização mundial de saúde (OMS) – consulta em 23-10-2020

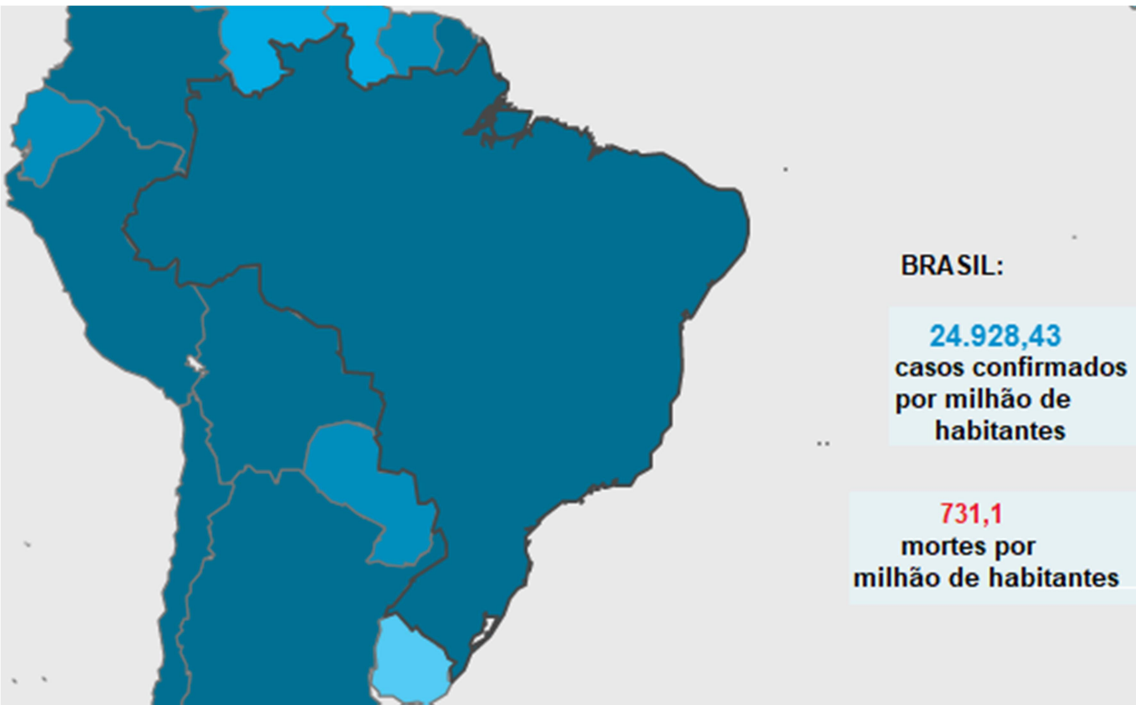

Figura 2: Painel de casos da COVID-19 por milhão de habitantes - Brasil

Fonte: Organização mundial de saúde (OMS) – consulta em 23-10-2020

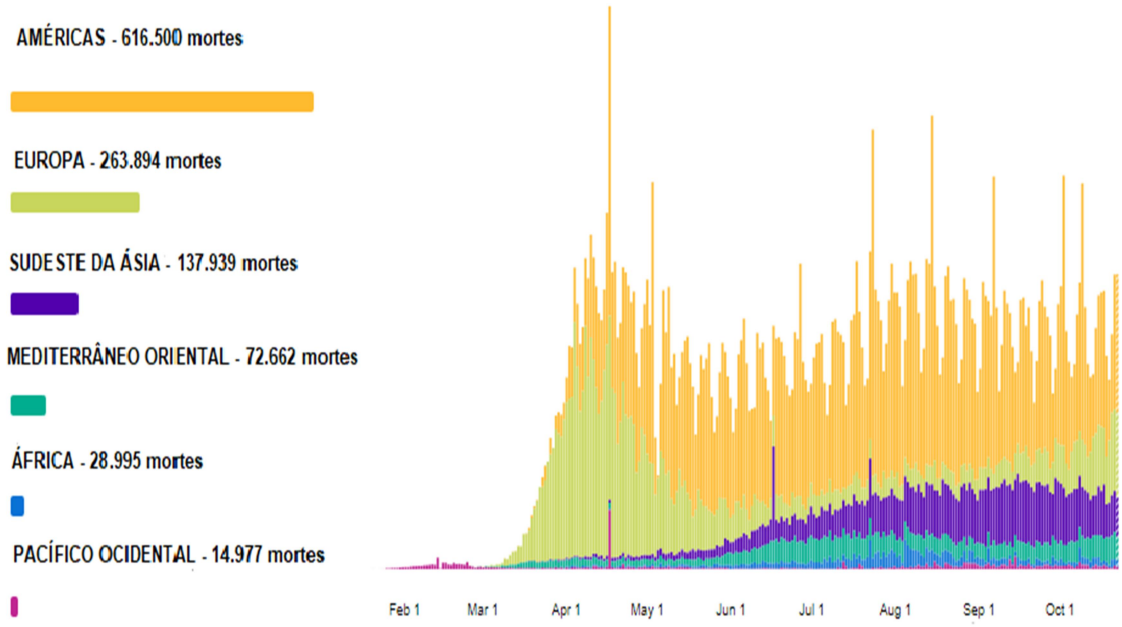

Figura 3: Mortalidade global por região da COVID-19

Fonte: Organização mundial da saúde (OMS) consulta em 23/10/2020

A pandemia de COVID 19 é tema de estudos e debates no meio científico visando compreender e explicar os mecanismos de transmissão, suscetibilidade e as diferenças de mortalidade entre os países baseado em dados que indicam um pior cenário dependente da geografia, história e genética dos indivíduos (SILVA 2020).

As técnicas convencionais para o diagnóstico da COVID-19, especialmente a de padrão ouro denominada RT-PCR, demandam tempo na liberação dos resultados impossibilitando a ação imediata em casos de indivíduos infectados e ao mesmo tempo causa impactos ao restringir à quarentena indivíduos não infectados. A busca por novas metodologias, que permitam diagnósticos mais rápido são de extrema importância para o tratamento e prevenção de novos casos e também minimizam o impacto social e econômico por meio de liberação de indivíduos com resultados negativos.

1.1 Objetivo geral

Avaliar a especificidade e sensibilidade da espectroscopia Raman na análise de soro de indivíduos acometidos por COVID-19 e estudar os padrões espectrais dos grupos doentes e saudáveis visando propor essa técnica como metodologia para o diagnóstico da COVID-19.

1.2 Objetivo específico

- ✓ Utilizar ferramentas estatísticas para identificação das diferenças espectrais entre os picos encontrados.
- ✓ Correlacionar as bandas espectrais obtidas com a composição química e biológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coronavírus

O coronavírus é da família *Coronaviridae* e possui esse nome em decorrência das espículas presentes em sua superfície, formando uma estrutura

semelhante a coroa quando observados em microscopia eletrônica. Surgiram há mais de 70 anos e são comuns em animais como gados, morcegos e camelos. Eram conhecidos como agentes de infecções respiratórias e entéricas em animais doméstico e em 15% dos resfriados comuns em humanos (PERLMAN et. al.2009).

Em 2002, uma classe de SARS-CoV infectou 8422 pessoas causando 916 mortes no mundo. No ano de 2012, o MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio), atingiu 1401 pessoas das quais 543 morreram. Em dezembro de 2019, foi detectado na China um novo coronavírus (SARS-CoV-2) causador da COVID 19, que se espalhou pelo mundo rapidamente tornando-se pandemia e motivo de interesse dos pesquisadores e da população mundial na finalidade de conter essa doença. Esses dados demonstram que o vírus é uma grande ameaça aos seres humanos trazendo consequências desastrosas à economia mundial (GENG et.al. 2020).

2.2 Estrutura do vírus SARS-CoV- 2

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavírus*, e seu genoma varia de 26 a 32 kb sendo composto por uma fita simples de RNA (ácido ribonucleico) e capsídeo, contendo nucleoproteínas (LU R et.al 2020). O sequenciamento genômico do vírus revelou semelhança em 96,2% a um morcego CoV RaTG13 sendo esse o provável hospedeiro natural do vírus (LU R et.al, MOUSAVUZADEH et.al, YAN RONG GUO et.al 2020). O SARS-CoV-2 é composto por vários tipos de proteínas, essas podem ser encontradas na membrana como a Spike e a glicoproteína transmembrana, no envelope e no Capsídeo (estrutura que envolve o material genético do vírus) Figura 4. Alguns coronavírus possuem também a proteína hemaglutinina-esterase (HE) que formam picos menores no envelope facilitando a entrada do vírus no hospedeiro além de colaborar na replicação viral (LU R et.al, MOUSAVUZADEH et.al, YAN RONG GUO et.al 2020).

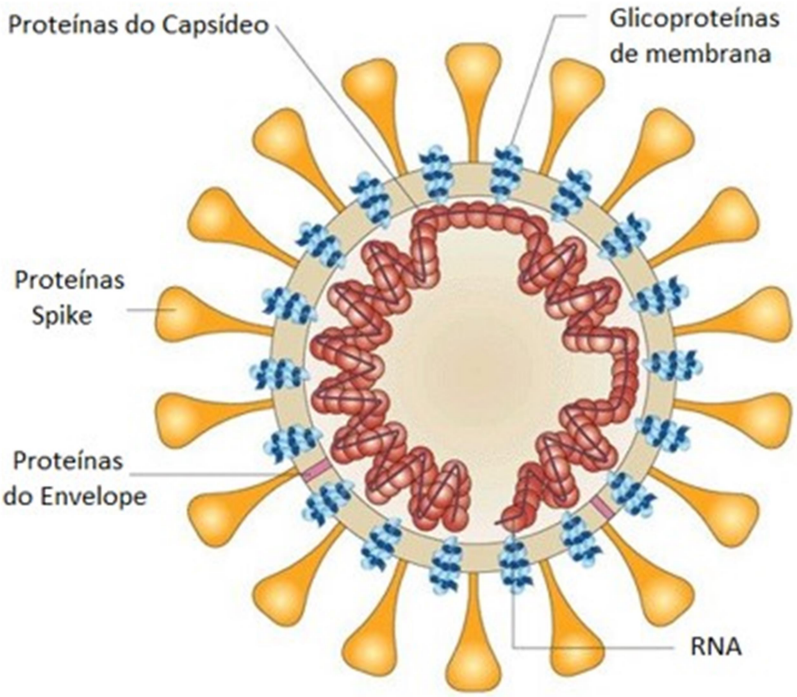

Figura 4: estrutura do coronavírus

Fonte: adaptado de Peiris, J.S.M.,Y.Guan, and K.Y.Yuen - "Severe acute respiratory syndrome" Nature medicine 10.12 (2004):S88-S97

.

2.2.1 Mecanismo de ação do vírus e patogênese

A entrada do SARS-CoV-2 na célula é realizada pela ligação da proteína S (Spike) com o receptor de ACE 2 (enzima conversora de angiotensina), que é uma proteína de membrana encontrada em órgãos como pulmão, coração, rins e intestino (JIA HP et.al., ZHOU P et.al. LIMA LNGC et.al 2020). Após essa ligação, a proteína S é convertida em duas subunidades denominadas S1 e S2. A subunidade S1 tem a finalidade de se acoplar ao receptor da célula enquanto a subunidade S2 é responsável pela entrada do vírus por meio de seu peptídeo de fusão (FP) que expõe os domínios HR1 (*heptad repeat1*) o qual interage com o domínio HR2 *(heptad repeat 2*) formando feixes denominados 6HB aproximando o vírus e promovendo sua entrada na célula (LIMA LNGC et.al. 2020) Figura 5. Após a liberação do genoma viral no interior da célula ocorre a tradução para duas

proteínas (pp1 e pp1ab) e posteriormente a transcrição do RNA mensageiro em segmentos de polaridade negativa e positiva com codificação de proteínas estruturais. A partir desses processos ocorre a replicação do RNA genômico e composição de novos vírions com liberação de partículas virais por exocitose. (JIA HP et.al, ZHOU P et.al., LU R et.al, LIMA LNGC et.al, de ALMEIDA JO et al).

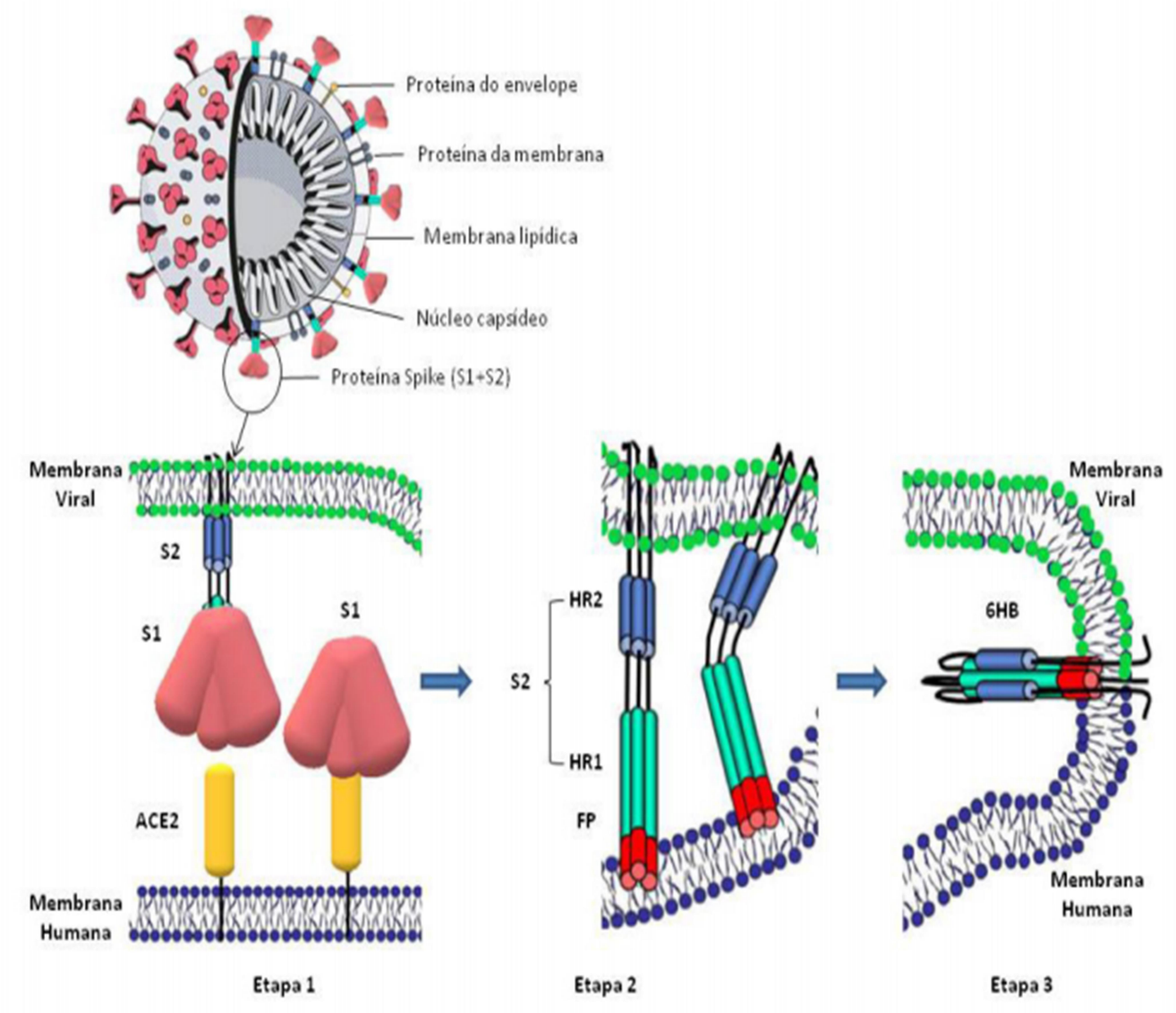

Figura 5- estrutura do SARS-Cov2 e mecanismo de entrada na célula

Fonte: Lima LNGC, Sousa MS, Lima KVB. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **J Health Biol Sci,** Fortaleza, v. 8, n. 1, p. 3, 2020.

2.2.2 Transmissão e manifestações clínicas da COVID-19

A transmissão do vírus SARS-CoV-2 ocorre por contato com indivíduos acometidos, objetos e superfícies contaminadas. A gravidade da infecção por SARS-CoV-2 pode se apresentar de maneiras diferentes nos indivíduos, abrangendo desde quadros assintomáticos, doença respiratória aguda e pneumonia com diferentes graus de gravidade (LAI CC et.al, P KELLAM et.al. AUWAERTER PG et.al. 2020). Ao diagnóstico clínico os sintomas mais comuns relatados são: febre ou sensação febril, respiratórios (tosse, dispneia, dor de garganta) e outros como dor de cabeça, mialgias, diarreia, náuseas e vômitos, perda ou diminuição do olfato e paladar (anosmia e ageusia).

Em crianças, são considerados também sintomas importantes a obstrução nasal, desidratação e falta de apetite e em idosos desmaios, confusão mental, sonolência excessiva, irritabilidade e falta de apetite. Devem ser investigados para COVID-19, indivíduos com síndrome respiratória aguda grave que apresentem dispneia e desconforto respiratório com saturação de oxigênio menor que 95% (SAÚDE GOV, OMS).

A recomendação do ministério da saúde para portadores assintomáticos ou que tiveram contato com indivíduos doentes é a auto-quarentena com isolamento por 14 dias (SAÚDE GOV).

Como não existem medicamentos comprovadamente eficazes tampouco vacinas contra a enfermidade, os agentes públicos de controle de doenças infecciosas enfrentam a necessidade de uma técnica de diagnóstico rápida e confiável para portadores do vírus SARS-CoV-2, a fim de controlar melhor o isolamento de pacientes infectados durante a pandemia de COVID-19. O diagnóstico precoce da COVID-19 também contribui para reduzir as chances de transmissão sustentada da doença em uma condição de achatamento da curva de contágio, em que o tempo para atingir o “pico” e a imunidade de rebanho torna-se maior (FERGUNSON NM et.al., THUNSTRÖM L et.al.). Outro fato importante é que em muitos países como no Brasil, o teste é feito apenas em pacientes sintomáticos, deixando de fora uma legião de indivíduos assintomáticos sem diagnóstico, porém, portadores do vírus (THUNSTRÖM L et.al., MARSON FAL et.al 2020). Além disso, há um consenso de que o vírus SARS-CoV-2 pode se tornar

endêmico com reinfecções (P. KELLAM et.al. 2020), e a doença de Covid-19 pode se tornar parte da “gripe sazonal”.

Em março de 2020, a OMS solicitou testes em massa da população a fim de identificar e isolar o maior número possível de pessoas infectadas. Um dos melhores exemplos dessa testagem veio da Coréia do Sul, que adotou estratégia de teste universal permitindo ao governo tomar medidas importantes na prevenção de novos casos e que junto com outras medidas, reduziram o número de casos e mortes (BALILLA, JEFFHRAIM 2020). Atualmente, o Brasil realiza 19,54 exames para cada mil habitantes, ficando atrás de países como Chile 110,57 / mil habitantes, Argentina 19,94 / mil habitantes, Itália 76,10 / mil habitantes, EUA 226,07 / mil habitantes e Reino Unido 183,35 / mil habitantes (OURWORLDINDATA).

O diagnóstico rápido e preciso da COVID-19 é de extrema importância para o manejo de pacientes positivos com isolamento e adaptação dos leitos hospitalares disponíveis à demanda (OMS, B. J. TROMBERG et.al).

2.2.3 Métodos laboratoriais de diagnóstico da COVID-19

A técnica padrão-ouro para detecção da COVID-19 é baseada na identificação do material genético do vírus (ácido ribonucléico - RNA) pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase) obtidas por amostras de nasofaringe e orofaringe coletadas com swab (C.LONG et.al., BASTOS ML et.al., AUWAERTER PG et.al.). Materiais broncoalveolares e de lavagem de escarro também podem ser usados em pacientes hospitalizados, bem como estudos indicam a presença no vírus em saliva, fezes e sangue (ADOLF LUTZ, WENLING WANG et.al. 2020).

No entanto, a técnica de PCR apresenta algumas limitações, como a necessidade de espaço físico específico para extração do material genético, equipamentos e pessoal treinado para realização do ensaio, custos mais elevados, tempo de liberação dos resultados maiores quando comparados aos testes sorológicos tradicionais, possibilidade de falso negativo, além disso, a coleta e transporte são pontos críticos na fase pré-analítica para que não ocorra degradação do material genético do vírus. (BASTOS ML et.al., XAVIER AR et.al, PAVÃO et.al. AUWAERTER PG et.al. 2020).

Dessa forma, os diagnósticos rápidos e precisos são essenciais para reduzir o impacto causado por testes com resultados falso-negativos, requerendo o desenvolvimento de novos testes diagnósticos (BASTOS ML et.al.,RODOLFO CASTRO et.al.).

O método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e Imunocromatografia, podem ser usados para detectar anticorpos IgA, IgM e IgG em diferentes fases da doença porém, possuem menor sensibilidade e especificidade que o teste de RT-PCR (PAVÃO et.al., AUWAERTER PG et.al. 2020).

2.3 Espectroscopia Raman

Os primeiros estudos em espectroscopia foram publicados no século XVIII, por Isaac Newton, que demonstrou que a luz do sol (luz branca), ao passar por um prisma, se dispersava em uma banda de cores que quando recombinadas por meio de outro prisma invertido, formava novamente a luz branca. Em 1921 o indiano Chandrasekhara Venkata Raman fez uma publicação intitulada “A cor do mar” onde explicava cientificamente que a cor do oceano era devido à dispersão da luz. Em 1928 ele descobriu o efeito Raman o que lhe rendeu o prêmio Nobel de física em 1930 (HANLON EB et.al. 2000).

O efeito Raman ocorre a partir da interação entre a luz e a matéria onde a radiação laser, ao excitar uma molécula, atua sobre sua camada eletrônica induzindo alteração no seu momento dipolar. Essa excitação molecular atinge níveis vibracionais que são inferiores às camadas eletrônicas (SALA et.al. 2003, SMITH et.al.2013, HANLON EB et.al 2000). No espalhamento inelástico chamado de Raman, uma parte da luz espalhada apresenta comprimento de onda diferente da luz incidente resultando em fótons de maior ou menor energia. No espalhamento Rayleigh o comprimento da onda da luz espalhada é a mesma que a da luz incidente (SMITH et.al.2013, HANLON EB et.al 2000).

A ER fornece espectros vibracionais característicos de moléculas (impressão digital - *fingerprint*) sendo ferramentas importantes na identificação de substâncias.

Os espectros obtidos pela ER apresentam componentes de fluorescência, radiação cósmica e outros ruídos os quais podem ser eliminados por meio de ferramentas matemáticas como algoritmos e polinômios ou ainda de forma manual. As fontes de excitação na faixa do infravermelho próximo tem demonstrado

eficiência na redução da fluorescência, comum na faixa do espectro visível, visto que o espalhamento decai com o aumento do comprimento de onda incidente (M BROWN 2000).

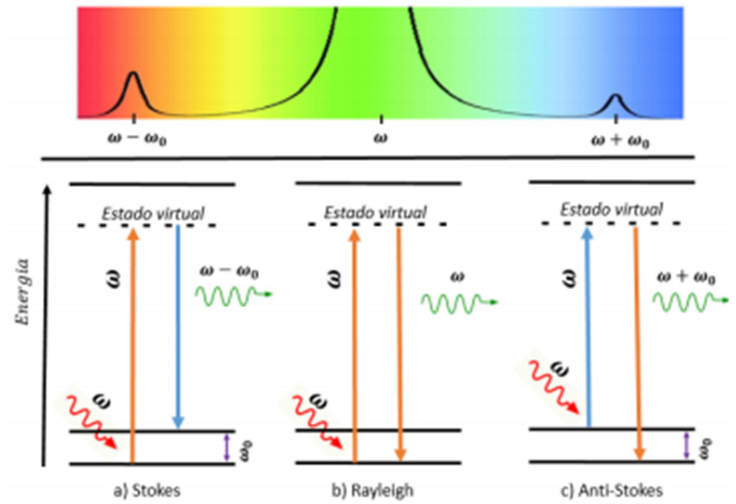

Figura 6: Esquema da transição entre os níveis de energia molecular e suas bandas Raman correspondente.

(a) espalhamento inelástico Raman Stokes, (b) espalhamento elástico Rayleigh, (c) espalhamento inelástico Raman Anti-Stokes.

As diversas formas de espalhamento, representadas na figura 6, ocorrem devido a diferentes estados vibracionais das ligações químicas e da capacidade de polarização em resposta a excitação formando picos denominados espectros Raman (M BROWN 2000, FARIA et.al. 1997, HANLON EB et.al 2000). Cada espectro consiste na intensidade versus a energia do fóton expressa em cm^{-1} , esses picos Raman aparecem sobrepostos formando as bandas espectrais. Cada pico possui três parâmetros (M BROWN 2000, FARIA et.al. 1997, HANLON EB et.al 2000):

a) posição máxima do pico: que informa o tipo de vibração e seu deslocamento informa as mudanças estruturais da molécula.
b) Intensidade do pico: fornece informações do número de grupos moleculares vibrando em determinada frequência e a intensidade integrada reflete a possibilidade de transição entre os níveis.
c) Largura do pico a meia altura: depende das condições do instrumento usado bem como da natureza da molécula e as interações vizinhas entre si. As

bandas podem se apresentar alargadas quando ocorre aumento de temperatura devido a maior interação entre as moléculas

A espectroscopia Raman é uma técnica promissora que tem chamado atenção de pesquisadores por apresentar resultados com elevada sensibilidade e especificidade quando comparados aos padrões ouro de diagnóstico e a possibilidade de determinar componentes moleculares de vários tipos de materiais de forma rápida e sem uso de reagentes.

2.3.1 Aplicações da espectroscopia Raman em materiais biológicos

Os métodos espectroscópicos de análise de materiais biológicos oferecem diversas vantagens em relação aos métodos bioquímicos moleculares, como: rapidez na obtenção de informações diagnósticas, dispensa do preparo de amostras ou do uso de reagentes, utilização de quantidade mínima de amostra e informações sobre a composição molecular dos materiais estudados em poucos minutos por meio de métodos estatísticos e ferramentas computacionais (C. H. LIU et.al 1992., C. KRAFFT et.al 2015, HANLON EB 2000).

A espectroscopia Raman tem sido amplamente usada para quantificar biomarcadores de doenças renais, como ureia e creatinina no soro (M. L. ALMEIDA et.al. 2016), para quantificar componentes de glicose e lipídios de soro (J SILVEIRA L et.al. 2017) em estudo de neoplasias (N A CORREIA et.al. 2020) e anemias carenciais como ferropriva e hemolítica como falciforme (DINIZ , JF et.al.2019, da Silva, W.R et. al. 2019) visando o diagnóstico.

2.3.2 Aplicações da espectroscopia Raman no diagnóstico de vírus

Alguns autores têm proposto o uso da espectroscopia Raman para o diagnóstico de vírus ou doenças virais (DUARTE J et.al. 2010, TONGA D et.al. 2019, CHENGA H et.al. 2020, KHANA S et. al. LIM JY et.al, PEZZOTTI G et.al., BILAL M et. al.2016), entre elas a COVID-19. Recentemente, foi apresentado um relatório preliminar sobre o desenvolvimento de um modelo estatístico para detectar vírus de RNA em saliva infectada com partículas virais por meio de espectroscopia Raman, discutindo possíveis aplicações e implicações no

diagnóstico de COVID-19 (S. DESAI et.al. 2020). Outro método proposto foi de "biópsia líquida" com base na avaliação de microRNA de cânceres usando plasma e pela metodologia de espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS – *surface enhanced Raman spectroscopy*) e fluorescência intensificada por *plasmón* (*PEF – Plasmon Enhanced Fluorescence*), que poderia ser expandido para o diagnóstico da COVID -19 (A. N. MASTERSON et.al. 2020). Um estudo mostrou que os vírus podem ser identificados de forma livre usando marcadores em espectroscopia Raman com ponta aprimorada (TERS), revelando a estrutura secundária da proteína e a composição de aminoácidos da superfície do vírus (DOU, T et.al. 2020). CARVALHO E NOGUEIRA (2020) sugeriram em uma “carta ao editor” que as técnicas vibracionais como Raman e espectroscopias de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) poderiam enfrentar os desafios para o diagnóstico precoce e rápido da COVID-19, alguns pesquisadores discutiram as possibilidades e desafios de desenvolver uma metodologia de teste espectroscópico com base em espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier FT-IR e Raman para analisar COVID-19 de amostras de soro, sangue, saliva, urina e comparar os resultados espectrais com o método de PCR atual (R. S. KHAN et.al.2020).

2.4 Ferramentas estatística para análise dos espectros:

São métodos matemáticos para tratamento dos dados obtidos na espectroscopia e tem por finalidade extrair os interferentes e maximizar as informações de relevância no estudo.

2.4.1 Análise por componentes principais (PCA)

A PCA é uma ferramenta que permite extrair de um conjunto de variáveis seus componentes principais, baseado na variância dos dados do grupo, gerando duas novas variáveis que são os componentes principais (PC) e escore (ES). O PC, por meio do escore, indica a intensidade de cada componente principal. OS PCs são subdivididos e a maior variação espectral é armazenada no PC1 e a extração das variações seguem sucessivamente até o componente de menor

variância, por meio dessas variáveis que são identificadas as semelhanças e diferenças nos grupos.

A análise por componentes principais (PCA) é uma ferramenta estatística multivariada que tem sido usada em espectroscopia Raman na detecção de alterações das amostras sanguíneas (M BROWN, HANLON EB 2000).

A análise exploratória tem por finalidade encontrar diferenças significativas entre as variáveis espectrais e associar com os componentes das amostras em estudo.

2.4.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS e PCA)

A ferramenta estatística PLS é utilizada para encontrar um modelo de regressão linear, gerando novas variáveis que podem ser preditas e observáveis. A PLS permite separar as amostras em regiões bem definidas graficamente, baseada no número de vezes que se repetem e que estão contidas nos componentes principais. A curva de Mahalanobis é comumente usada para encontrar dados análogos entre os grupos estudados (M BROWN, HANLON EB 2000).

A partir das diferenças encontradas nos componentes principais dos grupos em estudo, aplicam-se métodos estatísticos a fim de verificar o intervalo de confiança (valor p) e finalmente os dados são agrupados baseados em sua semelhança.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parecer ético

O projeto foi elaborado com base nos preceitos éticos e submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi, o qual emitiu parecer consubstanciado aprovando o projeto sob o protocolo nº 26691419.6.0000.5492.

3.2 Amostras

Foram selecionados 20 indivíduos, 10 deles com resultado positivo para COVID-19 (grupo COVID-19) e os outros 10 indivíduos com resultado negativo para COVID-19 (grupo controle) as análises laboratoriais foram realizadas pelo teste de RT-PCR que é considerado o padrão ouro e por ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). De cada indivíduo foi coletada uma amostra de secreção da nasofaringe, uma amostra de orofaringe e 5 mL de sangue no laboratório CIPAX Medicina Diagnóstica localizado na cidade de São José dos Campos, SP (Y. W. TANG et.al. 2020, J. F. CHAN et.al. 2020).

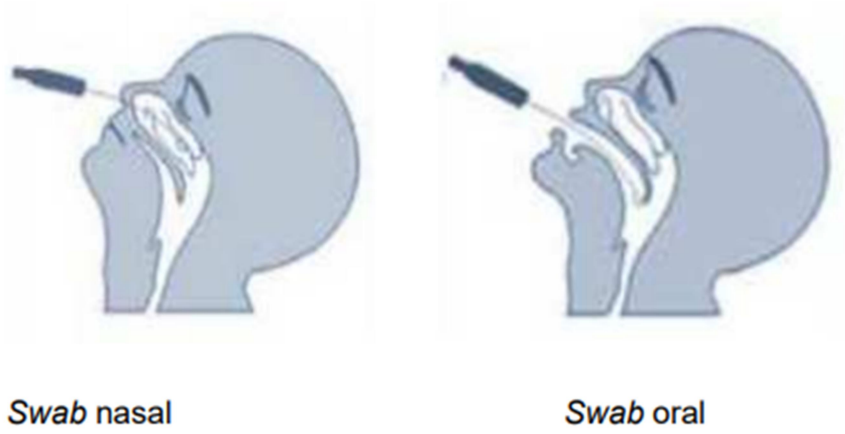

Figura 7: Sítio de coleta de secreção para pesquisa da COVID-19: nasofaringe e orofaringe
Fonte: ministério da saúde – Brasil

As amostras de secreção e sangue foram coletadas entre o terceiro e o décimo dia após o início dos sintomas. As manifestações clínicas relatadas pelos pacientes durante a coleta do material foram: febre (50%), tosse (50%), dor de garganta (40%), anosmia (30%), mal-estar (30%), coriza (30%), cefaleia (20%), falta de apetite (10%), dor abdominal (10%), dor corporal (10%) e pneumonia (10%).

Para a realização do RT-PCR a amostra da nasofaringe e orofaringe foi coletada por meio de dois swabs de poliéster e imediatamente colocada em um tubo com tampa de rosca contendo 3 mL de solução salina estéril (swabs e tubo da Kolplast, São Paulo, SP, Brasil). Os tubos foram transportados em posição vertical

à temperatura de 2°C a 8°C até o processamento da amostra [33, 62, 63]. O sangue total foi coletado por punção venosa em sistema fechado utilizando tubos com gel separador (Vacuette® Z Serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil). Os tubos de sangue foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 3.000 RPM (centrífuga modelo Elektra, Laborline, São Paulo, SP, Brasil) para extração do soro. As amostras de soro foram usadas para testes sorológicos. [64].

O material da nasofaringe e orofaringe foi submetido à análise por meio da metodologia RT-PCR RNA (kit Abbott Real-Time SARS-CoV-2 da marca Abbott Laboratories, São Paulo, Brasil), os resultados fornecem dados do RNA viral considerando como “detectável” ou “indetectável” e possibilitando o diagnóstico da doença COVID-19 [62]. A técnica de RT-PCR é considerada o padrão ouro na detecção da COVID-19 ao evidenciar o RNA do vírus através da amplificação de ácido nucleico, com sensibilidade de 95% e especificidade de 100% para um número maior que 100 cópias do vírus/mL conforme indicado na bula do kit [62].

As amostras de soro foram submetidas ao ensaio ELISA, para detecção de imunoglobulina IgA, usando o kit Euroimmun Anti SARS-CoV-2, da marca Euroimmun, São Caetano do Sul, SP, Brasil e processadas no equipamento Euroummun - Analisador I, Perkin Elmer Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

Após os testes ELISA, as 20 amostras de soro foram congeladas e posteriormente acondicionadas em caixas térmicas, mantidas de 2°C a 8ºC e transportadas ao laboratório de espectroscopia da Universidade Anhembi Morumbi onde as amostras foram separadas em grupos COVID positivo e negativo e submetidos à espectroscopia Raman.

3.3 Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional do Centro de Inovação Tecnologia e Educação (CITE) da Universidade Anhembi Morumbi, situado no Parque Tecnológico de São José dos Campos – SP.

No momento da análise, as amostras de soro foram descongeladas passivamente, homogeneizadas, e 80 µL do soro foram cuidadosamente pipetados por meio de uma micropipeta monocanal (molel P200, Bio-Rad inc., Hercules, CA,EUA) em orifícios de um suporte de amostra de alumínio, utilizado para a

leitura dos espectros Raman. A temperatura da sala foi mantida a 23°C e os ensaios foram realizados em ambiente com o mínimo de luz. As leituras foram realizadas em triplicada e a cada leitura o suporte de amostra foi movimentado minimizando o efeito do aquecimento do material biológico. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P1, Lambda Solution Inc, MA, EUA) conforme diagrama esquemático e imagem (figuras 8A e 8B)

O equipamento possui um laser de diodo multimodo estabilizado com excitação de 830 nm (infravermelho próximo) e potência do laser de 350 mW e possui resolução espectral de 4 cm^{-1} na faixa entre 400 e 1800 cm^{-1}. O tempo de coleta para cada espectro foi de 30 s (3 de 10 acumulações).

A detecção da luz espalhada é realizada por câmera CCD (*charge coupled device*) de 1340x100 pixels refrigerada por elemento termoelétrico (*Peltie*r) ventilado atingindo uma temperatura de trabalho de -75°C.

A aquisição e armazenamento dos espectros foram realizados por um computador usando o software Raman Soft *(Lambda Solution Inc. MA.EU*A) que controla o tempo de exposição do detector e número de aquisições por amostra e armazena os espectros para análises e interpretação posteriores.

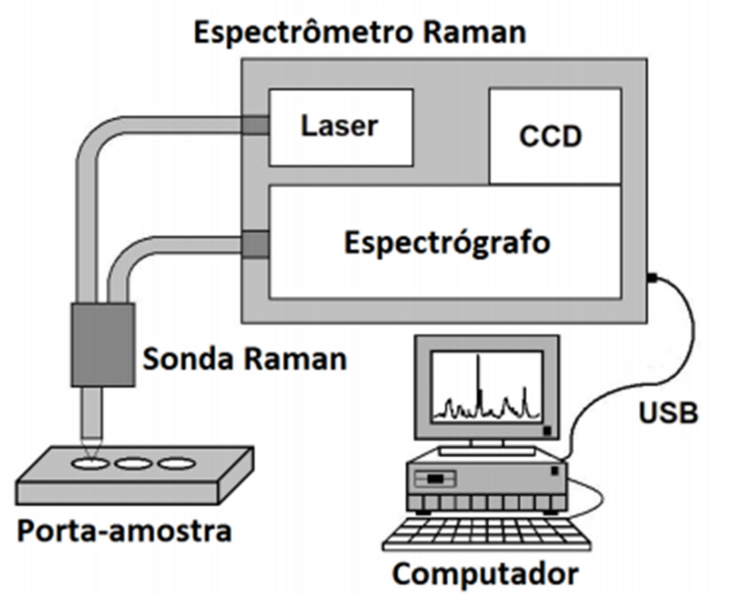

Figura 8-A Esquema do espectrômetro Raman dispersivo modelo Dimension P-1

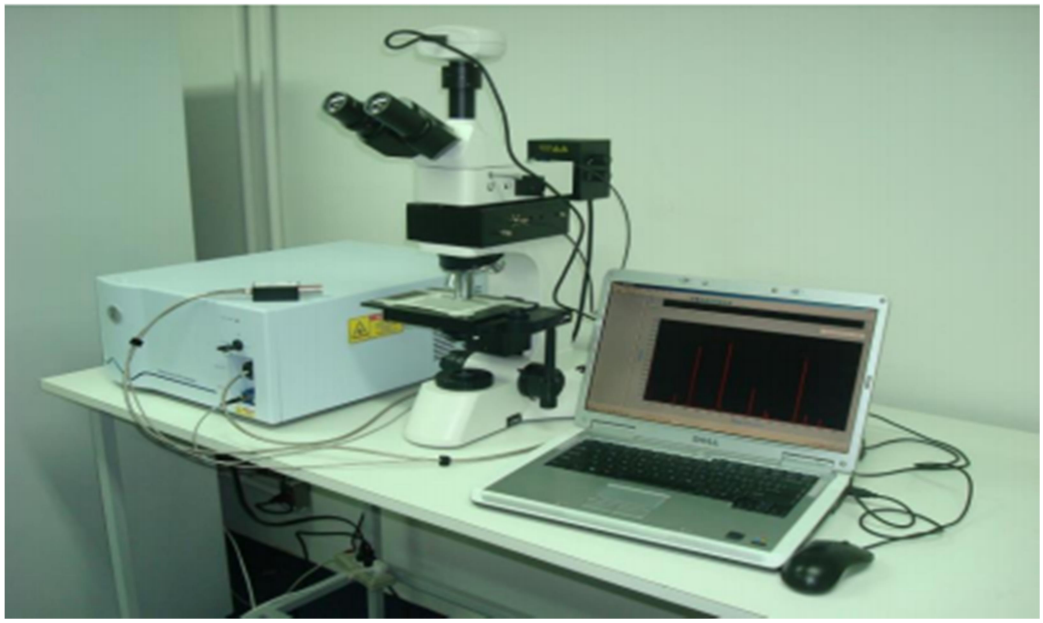

Figura 8-B Aparelho Raman dispersivo *modelo Dimension P1, Lambda Solution Inc, MA, EUA*

Antes da análise dos dados, os espectros Raman foram submetidos a pré-processamento para remoção da fluorescência utilizando um polinômio de ordem 7 ajustado na faixa espectral de 400 a 1800 cm $^{-1}$. Os raios cósmicos foram removidos manualmente e os espectros foram normalizados pela área sob a curva (norma 1) evidenciando os sinais obtidos e reduzindo os interferentes coletados durante a aquisição dos espectros.

Os espectros médios dos grupos COVID-19, positivo e negativo, foram plotados em software Excel indicando o deslocamento Raman, nesses gráficos os picos evidenciados foram marcados para as análises estatísticas. O teste de Student com nível de significância de 5% ($p<0,05$) foi usado com o objetivo de determinar as diferenças na composição bioquímica das amostras positivas e negativas. Valores entre os grupos ($p<0,05$) indica que as médias possuem características que as classificam em diferentes grupos.

3.4 Análise exploratória e análise discriminante

3.4.1 Classificação de componentes principais (PCA)

Os espectros Raman foram submetidos à PCA e teste t com objetivo de identificar as diferenças espectrais na constituição bioquímica dos soros entre os grupos positivos e negativos para COVID-19, após essa análise, por meio de referências na literatura, foi possível associar esses componentes principais às diferenças bioquímicas encontradas entre os grupos.

3.4.2 Análise discriminante baseada em PLS e PCA

As variáveis de PCA foram utilizadas em um modelo de análise discriminante (DA),que foi implementada por meio de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), usando toda a informação espectral em vez dos PCs selecionados (C.A.NUNES et.al 2012). Modelos multivariados como PCA e PLS têm sido usados para classificação de espectros Raman em amostras sanguíneas normais e leucêmicas (A.M.SILVA 2018) e para quantificação de analitos sanguíneos em soro humano para diagnóstico (L.SILVEIRA et.al. N.A, CORREIA et.al.2020).

Um teste de normalidade Kolmogorov Smirnov foi aplicado para verificar a normalidade dos PCs e o teste t de Student (com correção de Welch sempre que necessário) ou o teste U de Mann-Whitney foram aplicados aos PCs para identificar diferenças significativas entre os grupos Controle e COVID-19. O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

Os modelos foram desenvolvidos usando o aplicativo *Chemoface* (*www.ufla.br/chemoface*), usando a validação cruzada leave-one-out. Cada espectro foi considerado uma amostra nos modelos discriminantes.

4 RESULTADOS

4.1 Comparativo entre as metodologias convencionais

Os resultados das análises sorológicas por ELISA foram comparados ao teste padrão ouro RT-PCR e os resultados apresentaram-se concordantes para todos os indivíduos.

4.2 Espectros Raman de amostras de soro de Controle e COVID-19

Os espectros coletados das 20 amostras de soro passaram por pré-processamento e a média de cada grupo foi calculada bem como as diferenças espectrais entre eles, esses dados estão representados na figura 9.

Ambos os grupos demonstram características espectrais referentes ao soro humano com picos em 852, 941, 1003, 1319, 1341, 1450 e 1658 cm^{-1} que são atribuídos à albumina (V.J.LIN et.al. 1976, N. C. DINGARI et.al. 2012, A. LYKINA et.al. 2017, D. R. PARACHALIL et.al. 2019). Na figura 9 foram marcados os picos principais aos quais se aplicou análises estatísticas como teste t de Student identificando as diferenças significativas ($p<0,05$). Os espectros apresentaram diferenças evidenciadas por picos positivos e negativos ao longo da faixa espectral sugerindo que a composição de proteínas, lipídeos, aminoácidos, aminas, enxofre e ácido nucléico entre as amostras apresentam diferenças estatisticamente significativa ($p<0,05$). A tabela 1 apresenta estes picos e descreve o grupo bioquímico e as atribuições conforme descrito pelos autores. A análise exploratória por PCA foi usada para confirmar a natureza desta diferença bioquímica.

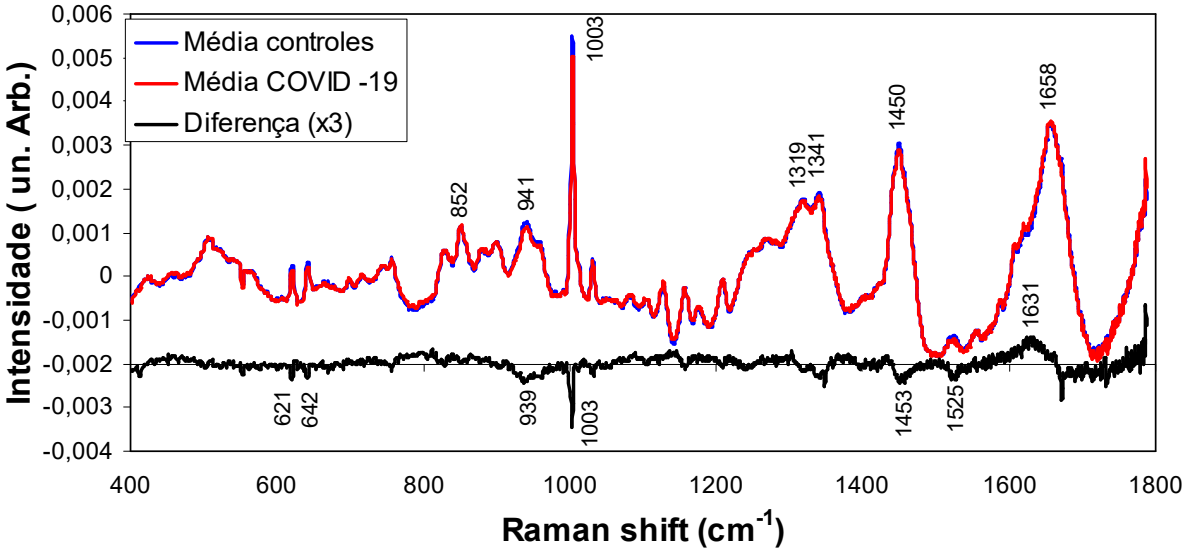

Figura 9. Média dos espectros Raman do grupo Controle e de pacientes com COVID-19 diagnosticado por RT-PCR. Os espectros de diferença (COVID-19 - Controle) também são mostrados, com picos positivos e negativos atribuídos a proteínas, lipídeos, aminas, aminoácidos e ácidos nucléicos.

Tabela 1 – Agrupamento bioquímico por posição dos picos e atribuição segundo a literatura:

Grupo bioquímico	Posição do pico (cm^{-1})	Atribuição	Referências
Proteínas e	751	Tryptofano (Tr)	3
	755	Proteína, Trp	9,10,11
	760, 761	Tryptofano (Trp)	3,4,9
	815	Tryptofano (Trp)	2
	880, 883	Proteína e Trp	3,4
	934	Proteína	3
	951	Proteína	3
	1002 a 1006	Fenilalanina (Phe)	1,3,6,7
	1029	Proteína, Colágeno	4
	1127	Proteína	4
	1130	Proteína	9,12
	1132	Proteína	9,12
	1156	Proteína	4
	1174	Proteína	4
	1175	Tirosina	4
	1210	Trp, Phe, Tirosina (Tyr), Amida III	9,11
	1225	Proteína, Amida III	9

	1234	Proteína	8
	1254	Proteína	4
	1260	Proteína e amida III	1
	1294	Proteína e amida III	4
	1333	Triptofano	7,9
	1344	Proteina	4
	1410	Glutationa	4
	1421	Proteina, DNA RNA	4
	1465	Amida 1 Proteina	4
	1552	Trp, Amida II	9,10,11, 13
	1586	Proteína e Tyr	9,10
	1606	Proteína, Tyr, Phe	9,10
	1623	Tirosina, Trp	9
	1658	Proteina e amida I	9,10,11,12,13
	1666	Proteina e amida I	11
Lipídeos	716	Lipídeos	2
	1130	Lipídeos e fosfolipídeos	9,10.12
	1225	Lipídeos	11
	1234	Fosfolipídeos	8
	1269	Lipídeos e fosfolipídeos	11,12,13
	1273	Lipídeos	2
	1334	Fosfolipídios	9,10,11
	1446	Lipídeos	8
	1454	Fosfolipídios	4
	1465	Fosfolipídios	3
	1656	Lipídeos	6
Carboidratos	1153	Carboidratos	1
	1378	Glucosamina	9,11
Carotenoides	958	carotenoide	1
	1004	beta caroteno	11,12
	1160	beta caroteno	9
	1525	carotenoide	2

1 Tonga at al.[51], 2 Kulla at al 3 Ditta at l ,5,7 Saranjam at al [7] 6 Chenga at al 8 Supti Roy at al 9 Gonzalez Solis et al 10 Vanna et al 11 Bankapur et al 12 Fernandes et al 12 Santos et al

4.3 Análise exploratória por PCA e significância segundo *t* de Student

Para a análise exploratória, foram utilizadas as variáveis do PCA (Scores - variâncias espectrais apresentadas nos dados espectrais e PCs - intensidades de cada escore nos dados originais).

Os gráficos de escores e componentes principais bem como a significância estatísticas de cada componente das amostras estão representados na Figura 10 onde os 6 escores foram responsáveis por 99,4% de toda a variação espectral.

O escore 1 representou as características espectrais do soro principalmente as proteínas albumina e globulina (V.J.LIN et.al. 1976, N. C. DINGARI et.al. 2012, A. LYKINA et.al. 2017, D. R. PARACHALIL et.al. 2019) e ambos os grupos apresentaram constituição semelhante e com a mesma intensidade indicados no PC 1($p>0,05$).

O escore 2 apresentou características espectrais atribuídas a proteínas que podem ser evidenciadas nos picos 939, 1003, 1454 e 1672 cm^{-1} (N. C. DINGAR et.al. 2012, Z. MOVASAGHI et.al. 2007, D. LIN-VIEN et.al. 1991) e carotenoides (picos em 1159 e 1529 cm^{-1}) D. LIN-VIEN et.al. 1991, pertencente ao grupo Controle, e características espectrais atribuídas a aminas / amidas e ácidos nucleicos evidenciados nos picos em 794, 1142, 1366 e 1630 cm^{-1} (D. LIN-VIEN et.al. 1991), pertencentes ao grupo COVID-19, portanto, no PC2 foi observado mais proteínas e carotenoides para o grupo controle e mais aminas/amidas e ácido nucléico para o grupo COVID-19. O PC 2 apresenta a diferença estatisticamente significativa indicada por teste t corrigido de Welch e $p <0,0001$. A maioria dessas características espectrais são as mesmas encontradas no espectro de diferença na Figura 9.

O escore3 mostrou características espectrais que são atribuídas aos carotenoides verificados nos picos em 1004, 1156 e 1525 cm^{-1} (D. LIN-VIEN et.al. 1991), mas sem diferença entre os grupos, como visto pelo PC 3 (teste U de Mann-Whitney diferença não significativa, $p = 0,387$).

O escore 4 apresentou características atribuídas aos aminoácidos - triptofano evidentes nos picos em 759, 1003 e 1348 cm^{-1} (D. LIN-VIEN et.al. 1991), especialmente para o grupo Controle e características atribuídas aos lipídeos para o COVID-19 visualizados nos picos1089, 1262, 1302, 1440 e 1657 cm^{-1} (N. C. DINGAR et.al. 2012, Z. Movasaghi et.al. 2007, D. LIN-VIEN et.al. 1991), como

representado pelo PC 4 (diferença estatisticamente significativa, teste t corrigido de Welch, p <0,01). Portanto, o escore 4 identificou maior quantidade de lipídeos para o grupo COVID-19 e menos aminoácido triptofano quando comparado ao grupo normal.

O escore 5 apresentou características espectrais que podem ser atribuídas à ureia (M.L ALMEIDA et. al. 2016) e possível artefato de raios cósmicos; o PC 5 não apresentou diferença significativa entre os grupos (teste t, p = 0,125) que podem ser em decorrência da população estudada não apresentar comprometimento renal.

O escore 6 mostrou características espectrais que podem ser atribuídas a proteínas e aminoácidos representadas pelos picos em 904, 942 e 1003 cm-1[1] (N. C. DINGAR et.al. 2012, Z. MOVASAGHI et.al. 2007, D. LIN-VIEN et.al. 1991), para o grupo de controle e características espectrais que podem ser atribuídas a compostos de enxofre (estiramento C – S – sugestivo de sulfetos) visualizado no pico 703 cm^{-1} (LIN-VIEN et.al. 1991, IVANCIUC T et.al. 2016), aminas / ácidos nucleicos remanescentes evidentes nos picos 1256 e 1435 cm^{-1} (Z. MOVASAGHI et.al. 2007) e carotenóides remanescentes identificados pelos picos 1007, 1159 e 1522 cm $^{-1}$) (Z. MOVASAGHi et.al. 2007), maiores para o grupo COVID-19, conforme observado pelo PC 6 (diferença estatisticamente significativa, teste t, p <0,05). Portanto, o Controle apresentou maior quantidade de aminoácidos e o grupo COVID-19 apresentou maior quantidade de lipídios, enxofre e carotenoides.

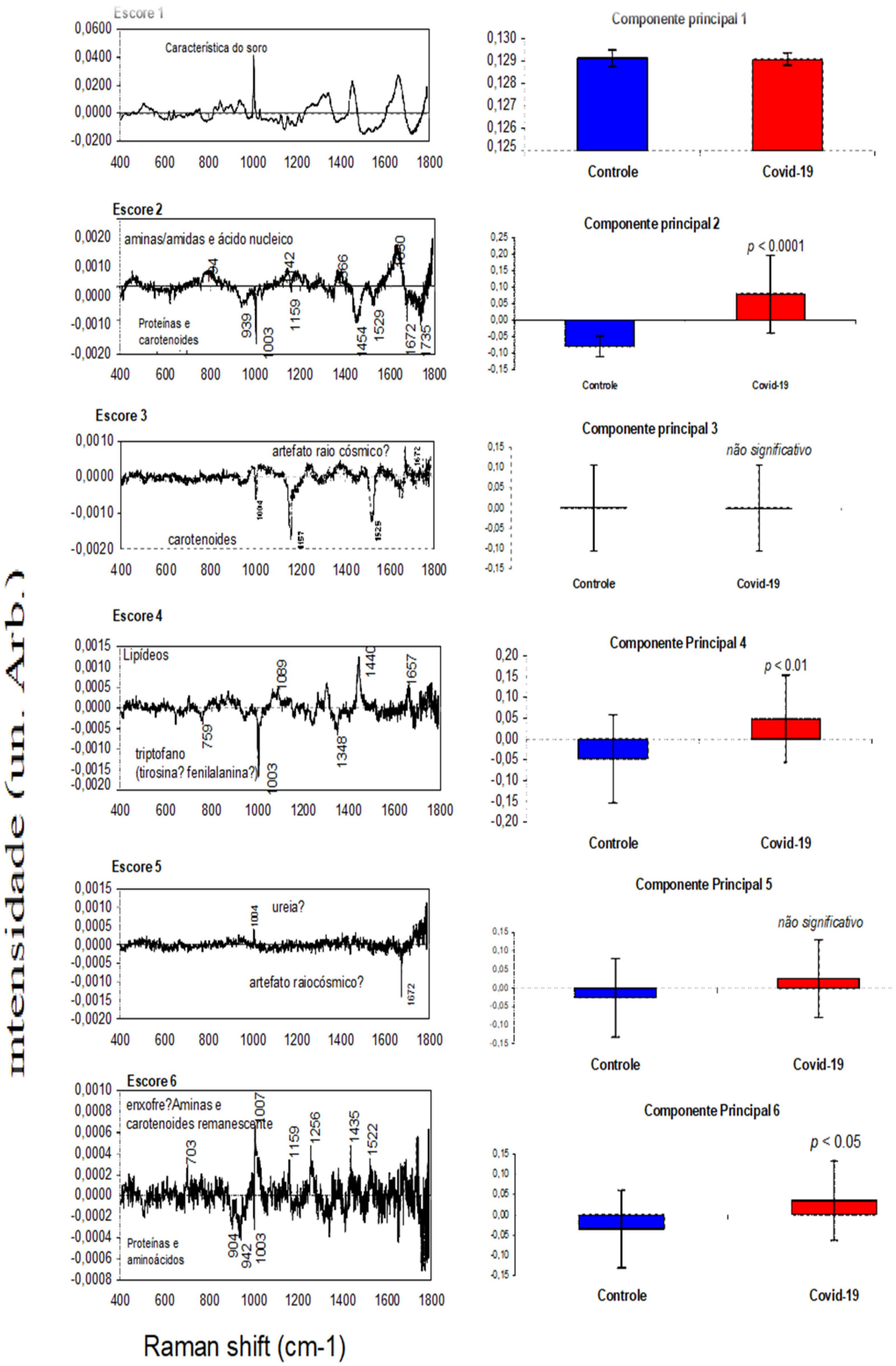

Figura 10. Gráfico das primeiras 6 variáveis de componentes principais escores e PCs. As características nas pontuações são atribuídas aos constituintes do soro, como albumina, proteínas, lipídeos, aminoácidos, ácidos nucléicos, compostos de enxofre e carotenoides. As intensidades em PCs mostraram diferenças significativas entre os grupos para PC2, PC4 e PC6 (teste t e teste U, p <0,05). NS = não significativo

4.4 Análise discriminante e modelos de classificação PLS-DA e PCA-DA

A partir dos espectros Raman de soros e dos PCs de ambos os grupos, foram desenvolvidos modelos de classificação usando análise discriminante. Esses modelos foram desenvolvidos por meio do aplicativo Chemoface (www.ufla.br/chemoface), utilizando a validação cruzada leave-one-out. Cada espectro foi considerado uma amostra nos modelos discriminantes.

Os modelos empregaram análise discriminante linear (LDA) aplicada aos PCs selecionados (aqueles com diferença significativa entre o Controle e COVID-19), a análise discriminante PCA (PCA-DA) e a análise discriminante PLS (PLS-DA) aplicada ao espectro inteiro, onde o número de vetores de carregamento (para o PCA-DA) e as variáveis latentes (para o PLS-DA) a serem modeladas foram definidos de acordo com a maior precisão de discriminação com menor número de vetores ou variáveis. Na tabela 2 é possível verificar os resultados da classificação para cada modelo em termos de sensibilidade, especificidade e precisão. A melhor classificação foi alcançada para o LDA usando 4 PCs (PC2, PC4, PC5 e PC6), com 87% de sensibilidade e 100% de especificidade. Apesar de não ser significativo (Figura 10), o PC 5 (ureia) foi essencial para a classificação obtida pelo LDA; sem ele, a classificação correta baixou para 88%.

Tabela 2. Sensibilidade, especificidade e porcentagem de classificação correta (acurácia), para a classificação de COVID-19 versus soros de controle pelas discriminações: LDA, PCA-DA e PLS-DA.

	LDA	PCA-DA	PLS-DA
N° variáveis Principais	4 componentes principais	4 componentes principais	5 variáveis latentes
Sensibilidade (%)	87	77	80
Especificidade (%)	100	100	100
Acurácia (%)	93	88	90

Componentes principais 2, 4, 5 e 6 (PC 2, PC 4, PC 5 e PC 6).

5 DISCUSSÃO

5.1 Principais evidências espectrais e sua correlação bioquímica

Em processos inflamatórios ocorre liberação de mediadores químicos provenientes de grânulos celulares ou do sítio da inflamação em decorrência a um estímulo. Algumas células envolvidas nesse processo são os macrófagos, mastócitos e leucócitos que após serem recrutados, seguem para o local de inflamação. Na COVID-19 ocorre aumento dos mediadores químicos da inflamação (M. THOMS et.al. 2012, E. ALOISIO et.al. 2020) incluindo as aminas vasoativas (histamina e serotonina), os metabólitos do ácido araquidônico (prostanglandina, leucotrienos e lipoxinas), citocinas (fator de necrose tumoral, interleucina e quimiocina), espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), as enzimas lisossômicas dos leucócitos. O aumento da amina identificado no espectro Raman de pacientes positivos para COVID-19 também pode ser explicado pela elevação nas transaminases (TGO e TGP), que são enzimas predominantemente hepáticas responsáveis pela transferência de um grupo amina do aminoácido alanina para o cetoglutarato formando glutamato e piruvato, outra causa da elevação das aminas pode ser decorrente do aumento da creatina (amina nitrogenada sintetizada no fígado) que é convertida em creatinina por meio de uma reação contínua e irreversível de desidratação e posteriormente é excretada na urina (B. M. HENRY et.al, D. WANG et.al 2020, B.SHEN et.al 2020). Portanto, essas aminas / amidas podem ser responsáveis pelas características Raman encontradas no Escore 2 que estavam presentes no soro do grupo COVID-19 positivo. Além disso, a presença de características espectrais referidas como ácidos nucléicos pode ser atribuída à presença de ARN do SARS-CoV-2 em soros de pacientes positivos e presentes nos Escores 2 e 6.

As proteínas são sintetizadas no organismo por meio dos ribossomos que são organelas constituídas pelas subunidades 40s (menor) e 60 s (maior). Para que haja a formação de aminoácidos o RNA mensageiro liga-se primeiramente a subunidade 40 s e posteriormente a 60 s, a trinca de bases nitrogenadas formam os diferentes aminoácidos que são traduzidos em proteínas. A proteína não estrutural (Nsp1) codificada pelo SARS-CoV2 afeta a subunidade 40s do

ribossomo, impedindo sua ligação com o RNA mensageiro e diminuindo a produção de proteínas, esclarecendo, portanto, os resultados mais baixos encontrados nos indivíduos COVID-19 e representados pelo Escore 2 (MATTHIAS THOMS et.al 2020).

O sulfeto de hidrogênio participa dos processos fisiológicos do trato respiratório incluindo contração do musculo liso, apoptose celular, estresse oxidativo e inflamação, níveis elevados de sulfetos podem estar associados à ação antiviral e antinflamatória desse gás e, portanto, o achado de enxofre observado no Escore 6 pode estar associado a esse processo (IVANCIUC T et.al.2016).

Um estudo recente de THOMAS et al. 2020 revelou alterações no metabolismo do triptofano correlacionadas ao processo inflamatório devido a liberação de interleucina-6, onde as diminuições de triptofano são proporcionais à gravidade da doença. Essa queda de triptofano pode ser verificada no escore 4.
Nesse mesmo trabalho foi identificado aumento nos níveis de lipídeos associados à atividade da fosfolipase A2 com consequente liberação de metabólitos que estão associados propagação de infecções e complicações tromboinflamatórias, esse aumento de lipídeos foi identificado no escore 4.

Outros mecanismos associados à elevação lipídica podem ser justificados pelo aumento no ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas, proteína C reativa todos associados à resposta inflamatória com objetivo de destruir o microrganismo [M.THOMS et.al. 2020, B.M.HENRY et.al. 2020, D. WANG et.al. 2020, B.SHEN et.al. 2020, IVANCIUC T et.al.2016).

Conclui-se que, o nível mais baixo de proteínas e aminoácidos e os níveis mais altos de lipídeos, aminas / amidas e compostos de enxofre observados nos espectros Raman estão alinhados com as mudanças associadas ao processo inflamatório existente em pacientes positivos para a COVID-19.

Estudos anteriores mostraram que a espectroscopia Raman pode ser usada para detectar e quantificar anticorpos IgG anti-Toxoplasma gondii em soros de gatos (DUARTE J et.al. 2015) e detectar anticorpos anticorpos IgM em soros de indivíduos com dengue (KHANA S et.al.2016, BILAL M et.al. 2016).

Os espectros Raman também foram usados para detectar infecção pelo vírus da hepatite (B -DNA e C-RNA) no soro (TONGA D 2019, CHENGA H 2020) e demonstraram diferenças nas concentrações de proteínas, colesterol, aminoácidos

e ácidos nucléicos que podem estar relacionadas à infecção do fígado (TONGA D 2019).

Para os pacientes com vírus da dengue (RNA), os picos de carotenóides (1156 e1516 cm^{-1}) diminuíram, resultados semelhantes ao que encontramos nesse estudo, enquanto os picos associados a imunoglobulinas, adenosina difosfato e hemoglobina aumentaram em pacientes positivos (KHANA S. et.al.2016).Os picos em 1153 e 1510 cm^{-1} podem ser atribuídos erroneamente a carboidratos e ácidos nucléicos ao invés de carotenoides (TONGA D 2019) e citosina (CHENGA H 2020) no grupo controle.

Conclui-se que essas infecções virais demostraram uma mudança particular na bioquímica dos soros e, consequentemente, diferenças nos espectros Raman.

5.2 Perspectivas futuras

É extremamente importante que novas tecnologias sejam utilizadas no diagnóstico das doenças virais, a fim de tornar o diagnóstico mais rápido e preciso possibilitando aos pacientes, tratamento precoce e adequado e minimizando as complicações decorrentes do contágio e desenvolvimento da doença, além de evitar impactos financeiros com internações como pudemos observar na pandemia da COVID-19. Soma-se a isso a necessidade de desenvolver uma técnica que tenha menor custo por procedimento para que seja viável como técnica de triagem nas redes públicas de saúde.

A técnica Raman pode se tornar uma metodologia rápida, precisa e menos onerosa para o diagnóstico de infecção viral, bem como uma possível utilização no diagnóstico diferencial entre COVID-19 e gripe sazonal (A-H1N1), além de associar alterações espectrais que se correlacionam à carga viral e consequentemente ao grau de infecção da COVID-19.

Estudos de outros grupos de pesquisa são necessários para confirmar os achados espectrais e para melhor correlacionar as assinaturas espectrais de lipídios, compostos de nitrogênio (aminas / amidas e ureia) e ácidos nucléicos encontrados no grupo COVID-19 com a diferença real na composição do soro dos grupos devido ao vírus. Além disso, é importante aumentar a amostragem de indivíduos positivos versus controles, bem como avaliar a possibilidade de usar a técnica Raman para testar indivíduos assintomáticos em grande escala atendendo

à necessidade de sistemas públicos de saúde e OMS, avaliando a presença de anticorpos no soro e adequando às necessidades de isolamento. O acompanhamento de pacientes positivos em convalescença também pode se beneficiar das vantagens da técnica pela rapidez e menor custo.

As características espectrais Raman relatadas para COVID-19 podem ser semelhantes a outras infecções virais que afetam o sistema respiratório, como influenza sazonal A-H1N1 (LIM J.Y et.al. 2015) e A-H3N2 (PEZZOTTI G et.al. 2019 ,portanto, estudos são necessários utilizando maior quantidade de amostras para identificar as características particulares associadas apenas ao COVID-19 e para promover um diagnóstico diferencial de infecções pela gripe sazonal com tratamento adequado à diferentes doenças,

6 CONCLUSÃO

Os modelos baseados na análise discriminante aplicada às cargas dos componentes principais (PC 2, PC 4, PC 5 e PC 6) puderam classificar os espectros com 87% de sensibilidade, 100% de especificidade e 93% de precisão.

A espectroscopia Raman aplicada para diagnosticar COVID-19 em soro humano mostrou alterações bioquímicas relacionadas à presença do SARS-CoV-2 como aumento de lipídeos, compostos nitrogenados (ureia e aminas / amidas) e ácidos nucléicos, e diminuição de proteínas e aminoácidos., demonstrando as possibilidades de uma técnica rápida e sem uso de reagentes para o diagnóstico da infecção por COVID-19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. Int J Surg. 2020;78:185-193. doi:10.1016/j.ijsu.2020.04.018

[2] https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020

[3] da Silva A, Silvio Fernandes. "Evolução da pandemia COVID-19: análise de evidências e projeção de cenários." https://www.researchgate.net/profile/Silvio_Fernandes_Da_Silva2/publication/342992191_Evolucao_da_pandemia_COVID19_analise_de_evidencias_e_projecao_de_cenarios/links/5f10b05245851512999f2afe/Evolucao-da-pandemia-COVID-19-analise-de-evidencias-e-projecao-de-cenarios.pdf

[4] Thiago Oliveira Neto, Tatiana de Souza Leite Garcia et Eduardo Spinussi, « Pandemia de COVID-19, as fronteiras pelo mundo e o transporte aéreo na Itália », *Confins* [En ligne], 44 | 2020, mis en ligne le 21 mars 2020, consulté le 29 septembre 2020. URL : http://journals.openedition.org/confins/27577 ; DOI : https://doi.org/10.4000/confins.27577

[5] Schuchmann AZ, Schnorrenberger BL, Chiquetti ME et al (2020) Vertical social isolation X horizontal social isolation: health and social dilemas in copping with the COVID-19 pandemic. Braz J Hea Rev 3(2):3556-3576. https://doi.org/10.34119/bjhrv3n2-185

[6] Ferguson NM, Laydon D, Nedjati-Gilani G et al (2020) Impact of non-pharmaceutical interventions (NPIs) to reduce COVID-19 mortality and healthcare demand. Imperial College COVID-19 Response Team. https://doi.org/10.25561/77482

[7] Chu, Derek K et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent personto-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. Thelancet, Vol 395 June 27, 2020 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9

[8] Garcia Filho C, Vieira LJES, Silva RM (2020) Buscas na internet sobre medidas de enfrentamento à COVID-19 no Brasil: descrição de pesquisas realizadas nos primeiros 100 dias de 2020. Epidemiol Serv Saúde 29(3):e2020191. https://doi.org/10.5123/s1679-49742020000300011

[9] Thunström L, Newbold SC, Finnoff David et al (2020) The benefits and costs of using social distancing to flatten the curve for COVID-19. J Benefit Cost Anal 1-17. https://doi.org/ 10.1017/bca.2020.12

[10] Marson FAL, Ortega MM (2020) COVID-19 in Brazil. Pulmonology 26(4):241-244. https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.04.008

[11] https://covid19.who.int/table consulta em: 26/09/2020

[12] Ministério da Saúde: https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#:~:text=A%20COVID%2D19%20%C3%A9%20uma,infec%C3%A7%C3%B5es%20assintom%C3%A1ticas%20a%20quadros%20graves.

[13] Perlman, S., Netland, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. Nat Rev Microbiol **7,** 439–450 (2009). https://doi.org/10.1038/nrmicro2147

[14] Geng Li,Yaohua Fan,Yanni Lai,Tiantian Han,Zonghui Li,Peiwen Zhou,Pan Pan,Wenbiao Wang ,Dingwen Hu ,Xiaohong Liu,Qiwei Zhang,Jianguo Wu -Coronavirus infections and immune responses **-**25 January 2020 https://doi.org/10.1002/jmv.25685

[15] Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet. 2020 Feb 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007145; PMCID: PMC7159086.

[16] LeilaMousavizadeh,SorayyaGhasemi - Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis - https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022

[17] Yan-Rong Guo , Qing-Dong Cao , Zhong-Si Hong , Yuan-Yang Tan , Shou-Deng Chen , Hong-Jun Jin , Kai-Sen Tan , De-Yun Wang e Yan Yan - The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status https://dx.doi.org/10.1186%2Fs40779-020-00240-0

[18] Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr - ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. - J Virol. 2005 Dec; 79(23):14614-21.

[19] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y , Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL- A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin - Nature. Mar de 2020; 579 (7798): 270-273.

[20] https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/30/diagnostico-laboratorial-do-coronavirus-sars-cov-2-causador-da-covid-19/

[21] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8

[22] Lima LNGC, Sousa MS, Lima KVB. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. J Health Biol Sci**,** Fortaleza, v. 8, n. 1, p. 3, 2020.

[23] Lai CC, Liu YH, Wang YC, et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): facts and myths. J Microbiol Immunol Infect. 2020. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.02.012.

[24] https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#sintomas acesso em 29-09-2020

[25] P. Kellam, W. Barclay, The dynamics of humoral immune responses following SARSCoV-2 infection and the potential for reinfection, J. Gen. Virol. 101(8) (2020) 791-797. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001439

[26] Balilla, Jeffhraim, Assessment of COVID-19 Mass Testing: The Case of South Korea (March 18, 2020). http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3556346

[27] BBC News Brasil em Londres – 24/04/2020 https://www.bbc.com/portuguese/internacional-52383539#:~:text=Lideram%20o%20ranking%20Isl%C3%A2ndia%20(127,infec%C3%A7%C3%A3o%20daqueles%20que%20foram%20testados%22.

[28]https://ourworldindata.org/grapher/full-list-cumulative-total-tests-per-thousand-bar-chart?tab=table&country=ECU~IND~IDN~ITA~KOR~TUR~USA~ISL~CHE~SGP~GBR~TWN~VNM~SEN~ZAF~NOR~EST~BRA – consulta em 23-08-2020

[29] Word Health Organization, Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19, World Health Organization. (2020). https://apps.who.int/iris/handle/10665/331509 acesso em 30-09-2020

[30] B. J. Tromberg, T. A. Schwetz, E. J. Pérez-Stable et al., Rapid scaling up of Covid-19 diagnostic testing in the United States - The NIH RADx initiative, N. Engl. J. Med. 383 (2020) 1071-1077. https://doi.org/10.1056/NEJMsr2022263

[31] C. Long, H. Xu, Q. Shen et al., Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRTPCR or CT?, Eur. J. Radiol. 126 (2020) 108961. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2020.108961

[32] Bastos ML, Tavaziva G, Abidi S et al (2020) Diagnostic accuracy of serological test for COVID 19 systematic review and metaanalysis. Br Med J 370:m2516. https://doi.org/10.1136/bmj.m2655

[33] Instituto Adolfo Lutz, Protocolo laboratorial para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para investigação de SRAG e SG por SARS-CoV-2. Instituto Adolfo Lutz, (2020). http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfolutz/publicacoes/coronavirus/orientacoesdecoletaestrategiadeampliacao_sg.pdf Acessed 15 August 2020.

[34] Wenling Wang, PhD; Yanli Xu, MD; Ruqin Gao, MD; et al -Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens-JAMA. 2020; 323 (18): 1843-1844. doi: 10.1001 / jama.2020.3786

[35] Xavier AR, Silva JS, Almeida JPCL et al (2020) COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. J Bras Patol Med Lab 56:e3232020. https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200049

[36] Rodolfo Castro, Paula M.Luz,Mayumi D.Wakimoto,Valdilea, G Veloso,Beatriz Grinsztejn,HugoPerazzo G.Veloso COVID 19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil – Science

[37] Nota Técnica: Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil Autores: Ana Luiza Pavão Letícia Janotti Maria de Lourdes Moura Carla Gouvêa Victor Grabois-

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/42557/2/Considera%C3%A7%C3%B5esDiagnosticoLaboratorialPandemia.pdf

[38] Sala, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. UNESP 2003, 115p
.
[39] Smith, e; Dent, G. Modern Raman sprectroscopy: a pratical approach. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. 217p

[40] M Brown Advances in Infrared and Raman Spectroscopy Vol Physics Bulletin, Volume 27, Number 12

[41] Richard L. McCreery -Raman Spectroscopy for Chemical Analysis

1 September 2000-DOI:10.1002/0471721646

[42] FARIA, D.L.A ; SANTOS, L.G.C.A. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. Química Nova, n.20, v.3, p.319-23, 1997.

[43] C. H. Liu, B. B. Das, W. L. Sha Glassman et al., Raman, fluorescence, and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media, J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 16(2) (1992) 187-209. https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)80008-J

[44] C. Krafft, J. Popp, The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. Anal. Bioanal. Chem. 407(3) (2015) 699-717. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8311-9

[45] M. L. Almeida, C. J. Saatkamp, A. B. Fernandes et al., Estimating the concentration of urea and creatinine in the human serum of normal and dialysis patients through Raman spectroscopy, Lasers Med. Sci. 31(7) (2016) 1415-1423. https://doi.org/10.1007/s10103-016-2003-y

[46] L. Silveira L, R. C. F. Borges, R. S. Navarro et al., Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics, Lasers Med. Sci. 32(4) (2017) 787-795. https://doi.org/10.1007/s10103-017-2173-2

[47] N. A. Correia, L. T. A. Batista, R. J. M. Nascimento et al., Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: A multivariate study on patients with normal and altered PSA values, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 204 (2020) 111801. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111801

[48] Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW et al (2000) Prospects for in vivo Raman spectroscopy. Phys Med Biol 45(2):R1-59. https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/2/201

[49] Auwaerter PG (2020) Coronavirus COVID-19 (SARS-COV-2). Johns Hopkins ABX Guide.
http://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540747/all/Coronavirus_COVID_19__SARS_CoV_2_. Acessed 05 August 2020.

[50] Duarte J, Pacheco MT, Villaverde AB et al (2010) Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-Toxoplasma gondii antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. J Biomed Opt 15(4):047002. https://doi.org/10.1117/1.3463006

[51] Tonga D, Chenb C, Zhangc J et al (2019) Application of Raman spectroscopy in the detection of hepatitis B virus infection. Photodiagnosis Photodyn Ther 28:248-252. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.006

[52] Chenga H, Xua C, Zhanga D et al (2020) Multiclass identification of hepatitis C based on serum Raman spectroscopy Photodiagnosis Photodyn Ther 30:101735. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101735

[53] Khana S, Ullaha R, Saleema M et al (2016) Raman spectroscopic analysis of dengue virus infection in human blood sera. Optik 127(4):2086-2088. https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.11.060

[54] Lim JY, Nam JS, Yang SE et al (2015) Identification of newly emerging influenza viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Chem 87(23):11652-11659. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02661

[55] Pezzotti G, Zhu W, Adachi T et al (2019) Metabolic machinery encrypted in the Raman spectrum of influenza A virus-inoculated mammalian cells. J Cell Physiol 235(6):5146-5170. https://doi.org/10.1002/jcp.29392

[56] Bilal M, Saleem M, Bilal M et al (2016) Raman spectroscopy-based screening of IgM positive and negative sera for dengue virus infection. Laser Phys Lett 26:115602. https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/11/115602

[57] S. Desai, S. V. Mishra, A. Joshi et al., Raman spectroscopy based detection of RNA viruses in saliva: A preliminary report, J. Biophotonics. (2020) e202000189. https://doi.org/10.1002/jbio.202000189

[58] A. N. Masterson, T. Liyanage, C. Berman et al., A novel liquid biopsy-based approach for highly specific cancer diagnostics: mitigating false responses in assaying patient plasma-derived circulating microRNAs through combined SERS and plasmon-enhanced fluorescence analyses. Analyst. 145(12) (2020) 4173-4180. https://doi.org/10.1039/d0an00538j

[59] T. Dou, Z. Li, J. Zhang et al., Nanoscale structural characterization of individual viral particles using atomic force microscopy infrared spectroscopy (AFM-IR) and tipenhanced Raman spectroscopy (TERS), Anal. Chem. 92(16) (2020) 11297-11304. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01971

[60] L. F. D. C. E. S. Carvalho, M. S. Nogueira, Optical techniques for fast screening - towards prevention of the coronavirus COVID-19 outbreak, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 30 (2020) 101765. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101765

[61] R. S. Khan, I. U. Rehman, Spectroscopy as a tool for detection and monitoring of Coronavirus (COVID-19), Expert Rev. Mol. Diagn. 20(7) (2020) 647-649. https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1766968

[62] Abbott RealTime SARS-CoV-2. Abbott Molecular Inc. (2020). https://www.molecular.abbott/sal/Abbott%20RealTime%20SARS-CoV2%20amp%20kit%20IFU%2051-608442%20R2.pdf. Acessed 15 August 2020.

[63] Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, Métodos laboratoriais para o diagnóstico de infecção capilar por SARS-CoV-2. Sociedade Brasileira

de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, (2020). http://www.sbpc.org.br/wp-content/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf. Acessed 15 August 2020.

[64] S. A. Ejazi, S. Ghosh, N. Ali, Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview, Immunol. Cell. Biol. (2020). https://doi.org/10.1111/imcb.12397

[65] Y. W. Tang, J. E. Schmitz, D. H. Persing, C. W. Stratton, Laboratory diagnosis of COVID 19: current issues and challenges, J. Clin. Microbiol. 58(6) (2020) e00512-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20

[66] J. F. Chan, C. C. Yip, K. K. To et al., Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel Real Time Reverse Transcription PCR assay validated in vitro and with clinical specimens, J. Clinical Microbiol. 58(5) (2020) e00310-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20

[67] T. Nguyen, D. D. Bang, A. Wolff, 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics, Micromachines (Basel). 11(3) (2020) 306. https://doi.org/10.3390/mi11030306

[68] C. A. Nunes, M. P. Freitas, A. C. M. Pinheiro, S. C. Bastos, Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics, J. Braz. Chem. Soc. 23(11) (2012) 2003-2010. https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073.

[69] A. M. Silva, F. S. S. Oliveira, P. L. de Brito, L. Silveira, Spectral model for diagnosis of acute leukemias in whole blood and plasma through Raman spectroscopy, J. Biomed. Opt. 23(10) (2018) 1-11. https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.10.107002

[70] V. J. Lin, J. L. Koenig, Raman studies of bovine serum albumin, Biopolymers. 15(1) (1976) 203-218. https://doi.org/10.1002/bip.1976.360150114

[71] N. C. Dingari, G. L. Horowitz, J. W. Kang et al., Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation, PLoS One. 7(2) (2012) e32406. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406

[72] A. Lykina, D. Artemyev, Analysis of albumin Raman scattering in visible and nearinfrared ranges. Proceedings of the Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX; Saratov, Russian Federation. 26-30 September 2017; (2017) p. 107160E. https://doi.org/10.1117/122317535

[73] D. R. Parachalil, C. Bruno, F. Bonnier et al., Raman spectroscopic screening of high and low molecular weight fractions of human serum, Analyst. 144(14) (2019) 4295-4311. https://doi.org/10.1039/c9an00599d

[74] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, Appl Spectrosc. Rev. 42(5) (2007) 493-541. https://doi.org/10.1080/05704920701551530

[75] D. Lin-Vien, N. B. Colthup et al., Appendix 3 - A summary of characteristic Raman and infrared frequencies. In: The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules, first ed., Academic Press, San Diego, 1991, pp. 477-490. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057116-4.50027-4

[76] M. Thoms, R. Buschauer, M. Ameismeier et al., Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2, Science. 369(6508) (2020) 1249-1255. https://doi.org/10.1126/science.abc8665

[77] B. M. Henry, M. H. S. Oliveira, S. Benoit et al., Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis, Clin. Chem. Lab. Med. 58(7) (2020) 1021-1028. https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369.

[78] E. Aloisio, M. Chibireva, L. Serafini et al., A comprehensive appraisal of laboratory biochemistry tests as major predictors of COVID-19 severity, Arch. Pathol. Lab. Med. (2020) https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0389-SA

[79] D. Wang, R. Li, J. Wang J et al., Correlation analysis between disease severity and clinical and biochemical characteristics of 143 cases of COVID-19 in Wuhan, China: a descriptive study, BMC Infect. Dis. 20 (2020) 519. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs19680/v1

[80] B. Shen, X. Yi, Y. Sun et al., Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera, Cell. 182(1) (2020) 59-72.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032

[81] A. R. Xavier, J. S. Silva, J. P. C. L. Almeida et al., COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection, J. Bras. Patol. Med. Lab. 56 (2020) e3232020. https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200049

[82] Matthias Thoms et.al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2 – Science 4 sep 2020, vol 369, Issue 6508 pp 1249-1255 - DOI: 10.1126/science.abc8665

[83] Ivanciuc T, Sbrana E, Ansar M et al (2016) Hydrogen sulfide is an antiviral and antiinflammatory endogenous gasotransmitter in the airways. Role in respiratory syncytial virus infection. Am J Resp Cell Mol Biol 55(5): 684-696. https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0385OC

[84] T. Thomas, D. Stefanoni, J. A. Reisz et al., COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status, JCI Insight. 5(14) (2020) e140327. https://doi.org/10.1172/jci.insight.140327

[85] de Almeida, J. O.; de Oliveira, V. R. T.; Avelar, J. L. S.; Moita, B. S.; Lima, L. M. COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (6), 0000-0000. Data de publicação na Web: 17 de Setembro de 2020 DOI: 10.21577/1984-6835.20200000