#### UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

STELLA GIANSANTE

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS

**TESE DE DOUTORADO** 

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, julho/2021

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

**STELLA GIANSANTE** 

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior

#### UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

#### STELLA GIANSANTE

# AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr. Orientador Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho (externo) Universidade Federal de São Paulo

> Prof. Dr. Pedro Luiz de Brito (externo) Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (interno) Universidade Anhembi Morumbi

> Prof. Dr. Carlos José de Lima (interno) Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenador) Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Alderico Rodrigues de Paula Junior (Suplente externo) Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE)

> Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (Suplente interno) Universidade Anhembi Morumbi

> > São José dos Campos, julho/2021.

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

#### STELLA GIANSANTE

Mestre em Bioengenharia (2014) pela Universidade Anhembi Morumbi. Graduada em Farmácia (2002) com habilitação em análises clínicas (2003). Especialista em Hematologia (2005) e Administração Hospitalar (2007). É Bioquímica da Prefeitura Municipal de Tangará da Serra desde junho de 2006 com vínculo estatutário.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G373a Giansante, Stella

Avaliação do desempenho analítico da Espectroscopia Raman para a determinação sérica de componentes bioquímicos / Stella Giansante. - 2021.

90f.: il.; 30cm.

Orientador: Landulfo Silveira Junior.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2021.

Bibliografia: f.79-90

1. Espectroscopia Raman. 2. Soro. 3. Análise discriminante. 4. Quantificação. 5. Perfil bioquímico.

CDD 610.28

Aleksandra Oliveira - CRB 8/6302

### **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, pela constante proteção e por sempre iluminar meus caminhos, pelas oportunidades e esperanças renovadas a cada dia.

Aos meus pais, Vilma e Edson, por todo empenho, apoio e dedicação durante minha vida e jornada acadêmica.

Ao meu filho Henrique, razão e luz da minha vida, um amor único e especial.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr., muito obrigada pela paciência, confiança e conhecimentos transmitidos.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro.

À Analista de Controle de Pós-Graduação, Nidia Lucia de Macedo, pelo grande apoio prestado durante toda a realização do programa.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, pelo convívio e conhecimentos transmitidos durante a realização das disciplinas.

Aos amigos do Doutorado Mário José de Rezende e Marcelo Pereira Lima, pela parceria durante o curso.

À Universidade Anhembi Morumbi, pelo apoio prestado.

À CAPES/PROSUP, pelo apoio financeiro durante a realização do Doutorado.

Ao Laboratório Oswaldo Cruz, por ceder as amostras de soro para os experimentos e à bióloga Fernanda Grubisich Tavares, pela preparação das amostras de soro.

L. Silveira Jr. agradece à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo) pelo apoio financeiro para a aquisição do espectrômetro Raman (Processo No. 2009/01788-5).

# AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A DETERMINAÇÃO SÉRICA DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS

#### **RESUMO**

Doenças crônicas não infecciosas têm tido destaque em diversas pesquisas, tendo em vista que são as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Entre essas patologias, destaca-se a doença cardiovascular, cujos fatores de risco (diabetes, dislipidemia e insuficiência renal) podem ser detectados por meio de avaliações de componentes bioquímicos séricos. Entre os mecanismos de prevenção e/ou controle enfatizam-se as avaliações periódicas buscando observar variações nas concentrações de componentes bioquímicos séricos dos indivíduos, e por isso novas metodologias de análise, entre elas a espectroscopia Raman, também são frequentemente pesquisadas buscando garantia de qualidade, otimização de tempo e de recursos financeiros. O objetivo deste trabalho foi a avaliação do desempenho analítico da espectroscopia Raman para análise in vitro de perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol), compostos nitrogenados não proteicos (ureia e creatinina) e glicose em amostras de soro humano. Para isto, um total de 242 amostras de soro humano obtidas de rotina laboratorial foram analisadas por espectrofotometria para quantificação de triglicérides, colesterol total, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose e posteriormente analisadas por espectroscopia Raman. O teste t de Student foi aplicado aos espectros Raman e apontou picos característicos dos elementos químicos com diferença significativa entre os grupos com concentração normal e alterada (p < 0.01). A discriminação das amostras entre grupos com concentrações de referência (normais) e alteradas foi possível através do uso de técnicas de estatística multivariada como a análise de componentes principais (PCA-DA) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), e também com a utilização das concentrações previstas pelos modelos multivariados PLS e PCA, obtendo melhores resultados utilizando a classificação através da concentração prevista pelo PLS. Já a concentração dos componentes bioquímicos do soro foi obtida por modelos de regressão PCA e PLS, tendo este último melhor desempenho para quantificação em relação ao modelo baseado em PCA. O erro analítico para a validação cruzada leave-one-out baseado na concentração prevista pelos modelos PLS foi de 10,5 mg/dL para colesterol total, 21,4 mg/dL para triglicerídeo, 13,0 mg/dL para HDL colesterol, 4,9 mg/dL para ureia, 0,21 mg/dL para creatinina, e 15,4 mg/dL para glicose. O coeficiente de Kappa mostrou concordância quase perfeita para colesterol total (0,83), forte para triglicerídeo (0,77), ureia (0,70) e creatinina (0,66), e razoável para HDL colesterol (0,38) e glicose (0,30). Os resultados demonstraram que a espectroscopia Raman pode ser considerada uma metodologia de importância para ser empregada em triagem populacional, principalmente para a quantificação de triglicerídeos e colesterol total séricos.

**Palavras-Chave:** Espectroscopia Raman. Soro. Análise discriminante Quantificação. Perfil bioquímico.

# ANALYTICAL PERFORMANCE OF RAMAN SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF BIOCHEMICAL COMPONENTS IN THE SERUM

#### **ABSTRACT**

Noncommunicable diseases have been highlighted in research as they are the main causes of death in Brazil and around the world. Among these diseases, cardiovascular disease stands out, whose risk factors (diabetes, dyslipidemia, and renal failure) can be detected through assessments of serum biochemical components. Among the prevention and/or control mechanisms, periodic evaluations are important and to observe variations in the concentrations of biochemical components in individuals' serum. Therefore, new methods for analysis, including Raman spectroscopy, are also frequently researched for quality assurance and to optimize time and financial resources. The objective of this work was to evaluate the analytical performance of Raman spectroscopy for in vitro analysis of lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol), non-protein nitrogenous compounds (urea and creatinine), and glucose in human serum samples. A total of 242 human serum samples obtained from the laboratory routine were analyzed by spectrophotometry to quantify triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, urea, creatinine, and glucose and then analyzed by Raman spectroscopy. Student's t test was applied to the Raman spectra which contained peaks characteristic of the chemical elements with a significant difference between the groups exhibiting normal and altered concentration (p < 0.01). Discrimination of samples between groups with reference (normal) and altered concentrations was possible through the use of multivariate statistical techniques including principal component analysis (PCA-DA) and partial least squares regression (PLS-DA), as well as with the use of the concentrations predicted by the multivariate models PLS and PCA. The best results were obtained through the concentration predicted by the PLS classification. The concentration of biochemical components in serum was obtained by PCA and PLS regression models, the latter achieving better performance for quantification than the model based on PCA. The analytical error for the *leave-one-out* cross-validation based on the concentration predicted by the PLS models was 10.5 mg/dL for total cholesterol, 21.4 mg/dL for triglyceride, 13.0 mg/dL for HDL cholesterol, 4.9 mg/dL for urea, 0.21 mg/dL for creatinine, and 15.4 mg/dL for glucose. The Kappa coefficient showed almost perfect agreement for total cholesterol (0.83), strong for triglyceride (0.77), urea (0.70) and creatinine (0.66), and adequate agreement for HDL cholesterol (0.38) and glucose (0.30). The results demonstrate that Raman spectroscopy can be considered an important methodology to screen the population, especially to quantify serum triglycerides and total cholesterol.

**Keywords:** Raman spectroscopy. Serum. Discriminant analysis. Quantification. Biochemical profile.

### SUMÁRIO

LISTA	DE ILUSTRAÇÕES							
	DE TABELAS							
	DE ABREVIATURAS E SIGLAS							
1	INTRODUÇÃO17							
1.1	OBJETIVOS20							
1.1.1	Objetivo Geral							
1.1.2	Objetivos Específicos							
1.2	HIPÓTESE							
1.3	JUSTIFICATIVA22							
2	REVISÃO DE LITERATURA23							
2.1	Importância do diagnóstico precoce para o controle de dislipidemia, diabetes e							
	doença renal crônica (DRC)							
2.2	Laboratório clínico como ferramenta de auxílio ao diagnóstico							
2.3	Avaliação da qualidade no laboratório clínico27							
2.4	Evolução tecnológica na rotina laboratorial							
2.5	Metodologia preconizada para análise de componentes bioquímicos –							
	espectrofotometria							
2.6	Metodologia proposta para análise bioquímica – espectroscopia Raman 30							
2.7	Ferramentas estatísticas utilizadas para a análise dos espectros							
2.7.1	Quantificação, discriminação e classificação através de ferramentas							
	estatísticas33							
2.7.2	PCA							
2.7.3	PLS							
3	METODOLOGIA							
3.1	Comitê de ética em pesquisa							
3.2	Amostras de soro							
3.3	Espectroscopia Raman							
3.3.1	Obtenção do espectro Raman							
3.3.2	Filtragem e pré-processamento dos espectros							

3.4	Regressão quantitativa dos elementos bioquímicos (colesterol total,									
	triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose) por métodos									
	multivariados									
3.5	Classificação das amostras de soro contendo os elementos bioquímicos									
	(colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose) por									
	métodos multivariados de discriminação PCA (PCR-DA) e PLS (PLS-DA) 42									
3.6	Parâmetros analíticos									
4	RESULTADOS									
4.1	Espectro Raman do soro, picos e atribuições baseadas nos constituintes									
	bioquímicos e na literatura									
4.2	Diferenças entre espectros médios das amostras com resultados normais e									
	alterados									
4.3	Modelos quantitativos baseados em regressão PLS e PCA									
4.4	Modelo de classificação baseado na discriminação via PCR e PLSR 59									
5	DISCUSSÃO									
5.1	Espectros das diferenças entre amostras com resultados normais e alterados . 70									
5.2	Modelos quantitativos baseados em regressão PCR e PLS									
5.3	Modelo de classificação entre normais e alterados baseado em discriminação									
	via PCA (PCR) e PLS									
5.4	Parâmetros analíticos comparando os resultados da espectroscopia Raman com									
	a metodologia padrão, baseados em PCR-DA e PLS-DA, e classificação por									
	discriminação usando as concentrações obtidas por PCA (PCR) e PLSR									
	quantitativo									
5.5	Limitações e aperfeiçoamento da espectroscopia Raman									
6	CONCLUSÃO									
REFER	ÊNCIAS									

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema simplificado da espectrofotometria
Figura 2. (a) Espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região
Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes)
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado das fases da pesquisa
Figura 4. Espectro Raman do soro humano e espectros Raman dos constituintes basais
colesterol, ácidos oleico e palmítico (que possuem bandas espectrais características de
lipídios), glicose (GLI), ureia (URE) e creatinina (CRE). Os picos 702, 1440, 1465 e
1675 cm <sup>-1</sup> são característicos de colesterol (COL); os picos 1065, 1135, 1300 e 1440
cm <sup>-1</sup> são característicos de ácidos graxos saturados (SAT); os picos 1085, 1265, 1300 e
1660 cm <sup>-1</sup> são característicos de ácidos graxos insaturados (INS); o pico 1004 cm <sup>-1</sup> é
característico de ureia; os picos 681 e 846 cm <sup>-1</sup> são característicos de creatinina; e os
picos em 520, 1065 e 1135 cm <sup>-1</sup> são característicos de glicose (GLI). O espectro sérico
apresenta outros picos além dos já citados e reflete sua composição em proteínas
(principalmente albumina) e outros metabólitos
Figura 5. Espectros médios normalizados de 241 amostras de soro humano com
concentrações normal e aumentada de colesterol total e a diferença entre os espectros
com resultados normal e aumentado para colesterol total (espectro com aumento de
10X). Os picos marcados apresentam diferença estatisticamente significativa (teste $t, p$
< 0,01) e podem ser atribuídos ao colesterol total. Os picos marcados com asterisco
apresentam diferença estatisticamente significativa (teste $t,\ p < 0.01$ ) e podem ser
atribuídos a carotenoide
Figura 6. Espectros médios e normalizados de 241 amostras de soro humano com
concentrações normal e aumentada de triglicerídeos, e diferença entre os espectros com
resultado normal e aumentado para triglicerídeos (espectro com aumento de 6X), e
espectros do ácido oleico e esteárico como estruturas químicas de referência basal para
triglicerídeos. Os picos marcados apresentam diferença estatisticamente significativa
(teste $t, p < 0.01$ ) e são característicos dos triglicerídeos
Figura 7. Espectros médios e normalizados de 240 amostras de soro humano com
concentrações normal e alterada de HDL colesterol, e a diferença entre os espectros com
resultado maior ou menor que 40 mg/dL (espectro com aumento de 15X). Os picos

marcados representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste t,
p < 0.01) e são característicos da fração HDL do colesterol. Os picos marcados com
asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa (teste $t$ , $p < 0.01$ ) e podem
ser atribuídos aos carotenoides
Figura 8. Espectros médios e normalizados de 240 amostras de soro humano com
concentrações normal e aumentada de ureia, e a diferença entre os espectros com
resultado normal e aumentada para ureia (espectro com aumento de 10X)54
Figura 9. Espectros médios e normalizados de 242 amostras de soro humano com
concentrações normal e aumentada de creatinina, e a diferença entre os espectros com
resultado normal e aumentado de creatinina (espectro com aumento de 6X)54
Figura 10. Espectros médios e normalizados de 239 amostras de soro humano com
concentrações normal e aumentada de glicose, e a diferença entre os espectros com
resultado normal e aumentado de glicose (espectro com aumento de 25X)55
Figura 11. Concentrações previstas de colesterol total em relação às concentrações de
referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada leave-one-out57
Figura 12. Concentrações previstas de triglicerídeos em relação às concentrações de
referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada leave-one-out57
Figura 13. Concentrações previstas de HDL colesterol em relação às concentrações de
referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada leave-one-out58
Figura 14. Concentrações previstas de ureia em relação às concentrações de referência
utilizando a regressão por PLS com validação cruzada <i>leave-one-out</i> 58
Figura 15. Concentrações previstas de creatinina em relação às concentrações de
referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada leave-one-out59
Figura 16. Concentrações previstas de glicose em relação às concentrações de
referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada leave-one-out59
Figura 17. Plotagem binária dos agrupamentos resultantes da discriminação baseada
nos valores das concentrações previstas por PLS mostrado na Tabela 8 (classificação
PLS utilizando valor da concentração prevista)63

#### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Coeficiente de correlação linear (r) dos reagentes utilizados na determinação
da dosagem dos componentes plasmáticos por espectrofotometria nos intervalos de
concentração especificados e equipamentos/acessórios utilizados para sua determinação39
Tabela 2. Valores de referência estabelecidos para colesterol total, triglicerídeo, HDL
colesterol, ureia, creatinina e glicose em soro sanguíneo humano, número de amostras
classificadas como normal e alterada conforme o valor de referência, total de amostras e
total de espectros obtidos a partir das amostras
Tabela 3. Representação dos resultados e interpretações de um teste para diagnóstico
adaptada para análise de elementos bioquímicos séricos
Tabela 4. Fórmulas para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo
positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), prevalência real, prevalência estimada,
classificação correta (precisão), classificação incorreta e coeficiente de Kappa45
Tabela 5. Atribuições dos picos com diferença estatisticamente significativa nos
espectros Raman do soro com concentração normal (referência) e alterada, conforme
Figuras 5 a 10 e referências correspondentes às atribuições das vibrações
moleculares
Tabela 6. Valores do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSEcv), do
coeficiente de determinação da validação cruzada (R <sup>2</sup> cv), e do coeficiente de correlação
linear (r) e erro dos modelos de regressão PCR e PLS em relação a cada componente
bioquímico do soro
Tabela 7. Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação
por PCR-DA e utilizando valor da concentração prevista por PCA61
por PCR-DA e utilizando valor da concentração prevista por PCA
Tabela 8. Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação
<b>Tabela 8.</b> Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação por PLS-DA e utilizando valor da concentração prevista por PLS
Tabela 8. Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação         por PLS-DA e utilizando valor da concentração prevista por PLS
<b>Tabela 8.</b> Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação por PLS-DA e utilizando valor da concentração prevista por PLS
<b>Tabela 8.</b> Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação por PLS-DA e utilizando valor da concentração prevista por PLS

Tabela	11.	Lista de	estudos	que e	exploraram a	a poss	sibilidad	e de	uso da o	espec	troscop	oia
Raman	em	análises	clínicas	para	determinaçã	io de	element	tos bi	oquímic	cos ei	m soro	е
sangue 1	total											69

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CRE – creatinina

DM – diabetes mellitus

FN – falso negativo

FP - falso positivo

GLI – glicose

HA – hipertensão arterial

HDL – lipoproteínas de alta densidade (high density lipoproteins)

hv – energia do fóton

INS - insaturado

 $I_0$  – intensidade de luz incidente

*I*<sub>t</sub> – intensidade de luz transmitida

IR – insuficiência renal

IRC – insuficiência renal crônica

LDL – lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoproteins)

N – número total de amostras

PCA – análise de componentes principais

PCR – regressão sobre os componentes principais

PCR-DA – PCA discriminante

Pe – taxa de aceitação hipotética

PLS – mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares)

PLS-DA - PLS discriminante

PLSR – regressão PLS

Po – taxa de aceitação relativa

POP – procedimento operacional padrão

*r* – coeficiente de correlação linear

R<sup>2</sup>cv – coeficiente de determinação da validação cruzada

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMSEcv – erro quadrático médio da validação cruzada

SAT – saturado

SERRS – espectroscopia Raman por ressonância de superfície melhorada

SERS – espectroscopia Raman amplificada por superfície

SM – síndrome metabólica

TERS – espectroscopia Raman amplificada por ponta

TRI – triglicerídeo

URE – ureia

UVRRS – espectroscopia Raman de ressonância no ultravioleta

VN – verdadeiro negativo

VP – verdadeiro positivo

VPN – valor preditivo negativo

VPP – valor preditivo positivo

#### 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares têm sido as principais causas de morte no Brasil (CHAVES et al., 2016) e no mundo (RAMASAMY, 2016; MOZAFFARIAN, 2017), tendo como fatores de risco eminentes a síndrome metabólica (SM), diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HA) e insuficiência renal (IR) (RAMASAMY, 2016). A SM, por exemplo, é representada por um grupo de fatores de risco cardiovasculares, entre os quais está a resistência à insulina com consequente aumento da glicemia, aumento da circunferência abdominal, pressão arterial, triglicerídeo e colesterol plasmático e, ainda, redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol – *high density lipoproteins*) (LEVESQUE; LAMARCHE, 2008; PINHO et al., 2014). Destaca-se que a hipercolesterolemia representa um fator de risco expressivo para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (PINHO et al., 2014), podendo os distúrbios metabólicos desencadear DM, obesidade, arteriosclerose e doença arterial coronariana (CHUNXIU et al., 2009).

Por sua vez, a insuficiência renal crônica (IRC), que pode ser ocasionada por DM tipo 2 e HA (MOMESSO et al., 2018), também é preocupante, já que influencia nas taxas de morbidade geral e cardiovascular (HE et al., 2017). Dessa forma, o monitoramento e detecção precoce de alterações na função renal são essenciais para a observação da evolução e controle de complicações causadas por distúrbios renais (CHUNXIU et al., 2009).

A análise laboratorial é um processo dinâmico que compreende o preparo do cliente para a coleta do material biológico, análise instrumental, diagnóstico, emissão e entrega do laudo ou resultado. Pode ser classificada em fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, em que a primeira compreende o processo que antecede a análise propriamente dita, seja realizada no ambiente laboratorial ou não (preparo do paciente, coleta, manipulação e armazenamento da amostra) (LIPPI, 2006; LIMA-OLIVEIRA et al., 2011). Já a fase analítica consiste no processo de geração de um resultado, compreendendo a seleção, qualificação, validação e indicadores de desempenho do sistema analítico e quantificação dos elementos bioquímicos investigados (CARRARO; PLEBANI, 2007; SCIACOVELLI et al., 2011). A fase pós-analítica inicia-se após a geração do resultado, sendo obtidos os laudos e finaliza-se com a

entrega do resultado ao cliente, conforme preconizado por legislações vigentes (CARRARO; PLEBANI, 2007; SCIACOVELLI et al., 2011). Apesar de as fases pré- e pós-analíticas serem as que mais podem ser alvos de erros laboratoriais, cada uma delas é importante para a confiabilidade no resultado e esclarecimento de uma condição patológica ou estado clínico do indivíduo (PLEBANI, 2007; GUZEL; GUNER, 2009; STRALEN et al., 2009; LEWIS; TORGERSON, 2012; BANCHS; SCHER, 2015; PLEBANI, 2016; RDC 166, 2017), sendo que na fase analítica as discrepâncias são bastante relevantes a fim de garantir um diagnóstico correto, já que nesta fase são determinados os valores ou resultados da análise (ENUE; GEORGIADIS; JOHNSON, 2000).

Em busca da minimização de erros, têm sido empregadas inovações tecnológicas em cada uma dessas fases, sendo que nas últimas décadas as rotinas manuais vêm sendo substituídas por processos automatizados (SIM; WRIGHT, 2005). Em meio aos avanços tecnológicos, os laboratórios de análises clínicas buscam metodologias analíticas que ofereçam resultados confiáveis com custo acessível e rapidez na execução da análise bioquímica (PREMASIRI; CLARKE; WOMBLE, 2001).

Nesse sentido, no desenvolvimento de uma metodologia analítica são utilizados critérios de validação que assegurem e que forneçam informações confiáveis e passíveis de interpretação, conforme determina a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC No. 166/2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e expõe que a validação de um método de análise deve demonstrar que ele apresenta resultados confiáveis e adequados ao fim que se destina (RDC 166, 2017). Entre os parâmetros utilizados para avaliação e comparação de metodologia estão a sensibilidade (limite de detecção ou capacidade de identificar corretamente amostras positivas), especificidade (seletividade ou capacidade de identificar corretamente amostras negativas), valores preditivos positivos (probabilidade de amostra avaliada com resultado positivo estar realmente com resultado alterado) e negativos (possibilidade de amostra avaliada e com resultado negativo ser realmente normal) (STRALEN et al., 2009; LEWIS; TORGERSON, 2012), prevalência real (proporção de indivíduos doentes) e estimada (proporção de indivíduos com testes positivos), precisão (classificação correta), classificação incorreta

e coeficiente de Kappa, que descreve a concordância entre as medidas de uma mesma amostra obtidas por duas ou mais metodologias (ENUE; GEORGIADIS; JOHNSON, 2000; SIM; WRIGHT, 2005).

Além disso, entre as tecnologias recentemente pesquisadas para utilização em laboratório de análises clínicas, destaca-se a espectroscopia Raman (PREMASIRI; CLARKE; WOMBLE, 2001; BARMAN et al., 2012; DINGARI et al., 2012), que possui vantagem de manutenção da integridade da amostra, já que dispensa a utilização de aditivos ou reagentes (técnica livre de reagentes ou *label-free*), o que leva à minimização dos custos e à diminuição de possíveis erros analíticos comparativamente ao método espectrofotométrico usualmente empregado em análises clínicas (COLOMBAN; GOUADEC, 2009; DREES; WU, 2010).

A espectrofotometria baseia-se na propriedade de absorção da luz dentro do espectro eletromagnético visível por moléculas dispersas em uma solução, analisando as grandezas físicas relacionadas à absorção e à emissão da luz, em que, ao haver incidência de fótons em uma amostra observa-se atenuação da sua intensidade através da absorção desses fótons pela amostra e eventual emissão de comprimentos de onda longos (DREES; WU, 2010). Na análise bioquímica de componentes séricos por espectrofotometria, ocorrem reações químicas ou atividade enzimática entre um reagente e a molécula-alvo que provocam alteração na intensidade da luz absorvida ou transmitida pela solução, sendo a absorção pela amostra proporcional à concentração do elemento bioquímico analisado (DREES; WU, 2010).

A espectroscopia Raman baseia-se na interação inelástica da radiação incidente em uma molécula polarizável que, ao espalhar-se, carrega informação da energia de vibração molecular (espalhamento Raman) (PARKER, 1983; HANLON et al., 2000). O espalhamento Raman proporciona elucidação da estrutura química do material através da interpretação das bandas de energia vibracional ou bandas de espalhamento Raman, com posterior análise (quali e quantitativa) por métodos multivariados, possibilitando assim tanto a diferenciação (discriminação) quanto a determinação da concentração dos diversos elementos químicos que caracterizam a amostra, através da interpretação da informação bioquímica de um único espectro (PARKER, 1983; HANLON et al., 2000).

Em vista disso, pesquisas têm demonstrado a utilização da espectroscopia Raman para a determinação e quantificação de componentes bioquímicos urinários e sanguíneos, mostrando resultados comparáveis aos métodos de referência para determinação da concentração de bilirrubina total, ureia, creatinina, colesterol total, glicose e proteínas (JIANAN; WILSON; SURIA, 1999; PREMASIRI; CLARKE; WOMBLE, 2001; QI; BERGER, 2007; BISPO et al., 2013; BORGES et al., 2015; SAATKAMP et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017). Dingari et al. (2012) propuseram a quantificação de albumina glicada no soro por meio da espectroscopia Raman. Almeida et al. (2016) desenvolveram modelo espectral baseado em regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) buscando correlacionar as concentrações de ureia e creatinina no soro através da espectroscopia Raman. Silveira et al. (2017) desenvolveram um modelo quantitativo baseado na regressão PLS para estimar a concentração de compostos bioquímicos plasmáticos tomando as concentrações bioquímicas avaliadas pelo método colorimétrico como as concentrações reais da amostra. Berger et al. (1997) demonstraram a determinação da concentração de glicose em sangue total por espectroscopia Raman. Borges et al. (2015) identificaram as diferenças espectrais relacionadas aos componentes lipídico e glicídico do soro humano por espectroscopia Raman. Qi e Berger (2007) desenvolveram um modelo espectral baseado em PLS para determinar concentrações de ureia e creatinina em urina e elementos bioquímicos plasmáticos bilirrubinas, ureia, creatinina, proteína, albumina glicose e perfil lipídico a partir da análise por espectroscopia Raman. Saatkamp et al. (2016) desenvolveram um modelo quantitativo baseado nos espectros Raman da urina para determinação da concentração de ureia e creatinina em indivíduos sem doença renal.

#### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo a análise do desempenho analítico da espectroscopia Raman para o desenvolvimento de um modelo quantitativo visando a determinação sérica das concentrações de colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol,

ureia, creatinina e glicose e, ainda, para a classificação entre amostra normal e alterada, tomando como referência as variáveis espectrais Raman comparativamente às concentrações de colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose pela metodologia analítica de referência (espectrofotometria) e pela espectroscopia Raman.

#### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificação de quais picos Raman são significativos para a determinação das diferenças espectrais entre amostras de soro com resultados bioquímicos normais (referência) e alterados para colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose, utilizando teste t de Student (p < 0,01);</li>
- Obtenção de modelos de quantificação desses componentes bioquímicos baseados em modelos de regressão multivariada por análise de componente principal (PCA e PCR) e PLS aplicados aos espectros Raman do soro utilizando as concentrações determinadas pelo método analítico tradicional (espectrofotometria);
- Classificação das amostras em grupo normal ou alterado utilizando as concentrações obtidas através da PLS e PCA.
- Obtenção de modelos de discriminação baseados nas técnicas PCA e PLS (PCR-DA
  e PLS-DA) para classificação das amostras em grupo normal (referência) e grupo
  alterado.

#### 1.2 HIPÓTESE

A hipótese desta tese é a de que componentes bioquímicos sanguíneos possam ser identificados e quantificados através da espectroscopia Raman, já que a essa técnica é capaz de fornecer informação bioquímica da amostra em estudo, e os espectros podem ser utilizados em modelos estatísticos multivariados. As diferenças espectrais reveladas por esses modelos, aplicados aos espectros Raman do soro humano, possibilitam a quantificação e a discriminação entre valores normais e alterados de elementos bioquímicos e viabilizam a utilização da espectroscopia Raman para triagem populacional.

#### 1.3 JUSTIFICATIVA

Os laboratórios de análises clínicas são importantes aliados dos profissionais de saúde, tendo em vista que subsidiam informações sobre o estado clínico de um indivíduo mediante a realização de exames. Buscando sempre a melhoria no atendimento, as inovações tecnológicas fazem parte da história dos laboratórios, já que nas últimas décadas houve um grande avanço no setor, onde rotinas integralmente manuais foram substituídas por processos totalmente automatizados. Mesmo com as melhorias, é um setor que sempre busca novidades para o melhor atendimento e também para redução de custos.

Analisando-se o mercado e tendo em vista que a espectroscopia Raman tem sido pesquisada com finalidade diagnóstica tendo como grande vantagem a redução de custos para o setor, já que não é necessária a adição de reativos químicos para a análise do material biológico, então, justifica-se a pesquisa da utilização da espectroscopia Raman para determinação de componentes bioquímicos séricos.

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Importância do diagnóstico precoce para o controle de dislipidemia, diabetes e doença renal crônica (DRC)

A avaliação clínica de distúrbios renais, diabetes e dislipidemias é conduzida pela análise laboratorial de elementos bioquímicos plasmáticos, em que dislipidemias são avaliadas determinando as concentrações séricas de triglicerídeo, colesterol total e suas frações, e distúrbios renais são analisados determinando, entre outros elementos, a glicemia e os compostos nitrogenados não proteicos (ureia e creatinina) (LIMA-OLIVEIRA et al., 2011; MOMESSO et al., 2018). Nessa perspectiva, a preocupação com a qualidade da análise laboratorial torna-se relevante no processo do cuidado, uma vez que exames laboratoriais fazem parte dos critérios para as tomadas de decisões durante a avaliação de um paciente (BOONE, 2007; SALLE et al., 2017).

Tendo em vista que a alta prevalência de doenças cardiovasculares tem causado preocupação mundial (CHAVES et al., 2016; RAMASAMY, 2016; MOZAFFARIAN, 2017), tem-se buscado a todo momento medidas preventivas dessa condição e de suas comorbidades, seja através do diagnóstico precoce ou mesmo por meio de controle de outras patologias ou condições que podem vir associadas aos eventos cardiovasculares (RAMASAMY, 2016; MOZAFFARIAN, 2017).

Para pacientes que fazem acompanhamento, controle e tratamento de doenças cardiovasculares, é necessário que ocorra o cuidado não somente com as alterações imediatas que esta condição possa trazer, mas também com outras doenças que possam estar relacionadas às doenças cardíacas (RAMASAMY, 2016).

Quando se avalia a condição clínica e a evolução de um paciente, normalmente se verifica que uma patologia inicial pode atuar como fator de risco ou agravo para outra doença, resultando em alterações em outros órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Como exemplo, tem-se as dislipidemias, diabetes e doença renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), já que não é rara a observação da evolução de um paciente diabético para dislipidemia e, depois, para insuficiência renal, assim como a maioria de pacientes com insuficiência renal apresenta alterações de lipídeos e de níveis de glicemia (SOUZA et al., 2012). Percebe-se, assim, que tais doenças atuam

conjuntamente, e seus efeitos deletérios se somam e exacerbam as complicações uma das outras. Por isso destaca-se a importância de uma política de prevenção de doenças, comorbidades e complicações (SOUZA et al., 2012).

Buscando entender um pouco mais sobre as dislipidemias, diabetes e insuficiência renal, verifica-se que o DM é uma doença frequente em indivíduos adultos e atinge qualquer condição social, tendo sido relacionada ao aumento das mortes por doença cardiovascular e complicações microvasculares (GROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2012). Alguns fatores contribuem para o aumento do número de casos de diabetes, entre eles o envelhecimento da população, sedentarismo, alimentação inadequada e possibilidade de obesidade. Anormalidades lipídicas são também frequente em indivíduos com DM tipo 2, elevando assim o risco de doença arterial coronariana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Sabe-se também que a obesidade e o sobrepeso são preocupações que fazem parte do perfil epidemiológico e são elementos de preocupação mundial, já que são fatores de risco para diversas condições clínicas (GARCEZ et al., 2014), principalmente a dislipidemia, hiperglicemia e doenças cardiovasculares (BEZERRA et al., 2011; GARCEZ et al., 2014).

A falta de controle e a cronicidade do diabetes pode ocasionar disfunção ou colapso de rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, amputações de membros inferiores, cegueira irreversível e doença renal crônica (GROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2012; GARCEZ et al., 2014). Além disto, pacientes com DM tipo 2 têm expectativa de vida reduzida em cinco a sete anos, com risco maior também de doenças cardiovasculares, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral, além de ter diminuída a sua capacidade produtiva (GROSS et al., 2002; GARCEZ et al., 2014).

Apesar de os mecanismos das complicações do diabetes serem ainda pouco esclarecidos, sabe-se que o tempo em que a doença existe associado a hiperglicemia crônica podem se somar a outros fatores tais como, dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo. Em razão disto, estes elementos devem ser controlados com medidas farmacológicas e não farmacológicas, para que seus efeitos potencializem os efeitos deletérios do diabetes no indivíduo. Assim, parte do acompanhamento do diabetes está associado à prevenção, à identificação e aos cuidados com estas complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Tendo em vista que medidas preventivas como alteração de hábitos alimentares e mudanças de estilo de vida podem retardar o início do diabetes, o diagnóstico precoce através de metodologias efetivas pode ser significante no processo de prevenção desta doença. Além disso, possibilita também a adoção de cuidados que possam prevenir o aparecimento da doença em pessoas que apresentam intolerância à glicose, podendo retardar o aparecimento das complicações decorrentes do DM (SOUZA et al., 2012).

A detecção precoce do DM é um dos fatores importantes para a prevenção de suas complicações, já que se trata de uma doença com prevalência crescente, em que o emprego de recursos humanos e financeiros do sistema de saúde é maior para tratar suas complicações (doença cardiovascular, diálise por insuficiência renal crônica, cirurgia com amputações de membros inferiores) do que para prevenir essas comorbidades através da detecção precoce. Dessa forma, o principal objetivo da prevenção é retardar tanto o aparecimento da doença como também o aparecimento de complicações caso ela seja prevalente no indivíduo (SOUZA et al., 2012).

A função renal tem papel essencial na manutenção da homeostasia do organismo e, por isto, o seu comprometimento pode acarretar a disfunção de outros órgãos afetando a saúde do indivíduo (GOMES; RACHEL; MASTROIANNI, 2010; ROSO et al., 2013). Pacientes com DRC normalmente apresentam disfunção no metabolismo de lipídeos mesmo em estágio inicial, logo é extremamente importante avaliar, controlar e pesquisar estas alterações em pacientes com DRC (GOMES; RACHEL; MASTROIANNI, 2010). Também muito frequente em pacientes com DRC é o DM (GOMES; RACHEL; MASTROIANNI, 2010).

Entre os fatores de risco para a suscetibilidade ao desenvolvimento da DRC estão hipertensão, DM, doença cardiovascular, história de DRC na família e idade avançada e a dislipidemia (ROSO et al., 2013). Assim, diagnosticar precocemente a DRC pode favorecer ao tratamento precoce e o acompanhamento podendo ao menos retardar as principais complicações, tais como doenças cardiovasculares (PORTO et al., 2017).

#### 2.2 Laboratório clínico como ferramenta de auxílio ao diagnóstico

A medicina laboratorial abrange diversos setores, entre eles estão a patologia clínica, a anatomia patológica e a indústria do diagnóstico, cujas atividades refletem na atenção à saúde, por via do diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico (CAMPANA; OPLUSTIL; FARO, 2011). Destaca-se também a prevenção de doenças por meio do diagnóstico precoce laboratorial, já que está relacionada à otimização de recursos investidos em com saúde, tanto na esfera pública quanto na iniciativa privada (CAMPANA; OPLUSTIL; FARO, 2011).

Os exames laboratoriais oferecem elementos para que médicos e demais profissionais da área da saúde sejam resolutivos na conduta terapêutica e tomada de decisões frente a uma patologia ou a uma condição clínica (FELDER et al., 2000).

A área de diagnóstico laboratorial tem se deparado com um mercado muito competitivo e por isso é necessário que melhorias constantes subsidiem a eficiência no desempenho garantindo a sobrevivência da empresa diante de um mercado que prima pela qualidade aliada a custo acessível (FELDER et al., 2000).

Nessa direção, o conceito de qualidade também evoluiu juntamente com o avanço laboratorial, visto que o principal objetivo dos laboratórios é a garantia de que os resultados obtidos reflitam a real condição clínica dos pacientes, assegurando assim a satisfação dos seus clientes, sejam eles pacientes ou prescritores (FELDER et al., 2000). Visando a garantia de qualidade laboratorial, é também necessário que todos os processos sejam controlados, tornando-se possível identificar e rastrear eventuais inconsistências nas fases analíticas, além de ter mecanismos para minimizar as consequências de erros que porventura aconteçam (CHAVES, 2010).

Os processos laboratoriais incluem três fases, sendo a pré-analítica, analítica e pós-analítica, e todas elas devem ser minuciosamente controladas para a garantia da qualidade, sendo a padronização dos processos documentados através de procedimentos operacionais padrões (POP) de acesso facilitados aos colaboradores um dos mecanismos para isto, assim como adesão a programas externos e internos de qualidade (CHAVES, 2010).

#### 2.3 Avaliação da qualidade no laboratório clínico

Atividades planejadas com a finalidade de satisfazer critérios de qualidade garantem a excelência nos processos de diagnóstico, e o cuidado abrange todas as fases laboratoriais, sejam elas pré-analíticas, analíticas ou pós-analíticas (BERLITZ, 2010).

É na fase analítica que a automação laboratorial tem grande participação, contribuindo para a minimização e reconhecimento de erros, diminuição do tempo de execução de uma análise, e, ainda, otimização de recursos financeiros, aumento de produtividade, diminuição de custos operacionais e melhoria na qualidade dos resultados, redução significativa do tempo de atendimento total considerando desde a coleta, processamento e entrega do resultado (BERLITZ, 2010).

Já a fase pré-analítica compreende desde o preparo do paciente para a coleta do espécime diagnóstico como também a identificação, acondicionamento e transporte das amostras. Ao passo que a fase analítica corresponde ao processamento do material biológico, em que, além de mão de obra qualificada, são utilizados equipamentos, reagentes e materiais. E por último, a fase pós-analítica corresponde à confecção do laudo, emissão e entrega do resultado ao solicitante ou paciente (BERLITZ, 2010).

Sabendo-se da importância de um resultado laboratorial para a conduta clínica, torna-se essencial o controle de qualidade no processo analítico, que compreende o conjunto de elementos necessários para a realização de um exame (equipamentos, reagentes, suprimentos, pessoal, geração de resultado) (MENDES; SUMITA, 2010).

Para que uma metodologia seja utilizada, é necessário que seus parâmetros de desempenho e limitações sejam conhecidos (MENDES; SUMITA, 2010). Anteriormente a implementação de tecnologias à rotina laboratorial, quando havia predomínio da utilização de técnicas manuais, os laboratórios eram também carentes de padronização de procedimentos, o que não garantia a sua exatidão nem tornava possível a comparação entre resultados (MENDES; SUMITA, 2010).

Para a obtenção de dados confiáveis pelo laboratório é necessária a implementação de um programa de controle de qualidade, no qual ensaios de proficiência são realizados e controles positivos e negativos são utilizados. Por isto, geralmente são utilizados dois tipos de programas de qualidade, o externo ou

interlaboratorial e o interno ou intralaboratorial, ambos muito importantes para validação do processo analítico, normatizados pela RDC 302, que formaliza a obrigatoriedade da realização de controles de qualidade (RDC 302, 2005; MARTELLIA, 2011).

No controle de qualidade externo ou interlaboratorial, o laboratório recebe amostras, cujos resultados são desconhecidos e, em seguida as análises são realizadas e seus resultados reportados a um sistema que, finalmente, é avaliado quanto à confiabilidade (MENDES; SUMITA, 2010). Já o controle de qualidade interno ou intralaboratorial é composto por perfis de amostras com concentrações conhecidas, podendo ser normais e/ou alterados, que são realizados antes da rotina diária para que seja validada e então se inicie o processamento das amostras (MENDES; SUMITA, 2010).

Neste sentido, os resultados dos controles de qualidade têm a finalidade de validação do ensaio, já que eles devem corresponder aos valores previstos pelas amostras utilizadas como controle de qualidade (MENDES; SUMITA, 2010).

#### 2.4 Evolução tecnológica na rotina laboratorial

O desenvolvimento tecnológico trouxe uma nova perspectiva aos laboratórios de análises clínicas, já que rotinas manuais foram substituídas por processos totalmente automatizados, com equipamentos de acesso randômico e interfaceamento de resultados, sendo estas evoluções essenciais tanto para manter o mercado competitivo como também para a sobrevivência das empresas de diagnóstico (FELDER et al., 2000; MUGNOL; FERRAZ, 2006).

Ao mesmo tempo, mecanismos para garantia de qualidade também foram preconizados, assegurando assim confiabilidade aos resultados. Com isto, são inúmeras as vantagens de inovações tecnológicas, dentre elas, diminuição de custos tanto com material, despesas de manutenção e recursos humanos além de expressiva diminuição no tempo de execução com aumento de produtividade, proporcionando assim, eficiência e otimização no processo analítico (FELDER et al., 2000; MUGNOL; FERRAZ, 2006).

A robótica e a informática fazem parte deste processo de evolução laboratorial, promovendo melhoria na qualidade, produtividade, otimização do custo operacional e

do tempo entre a coleta do material biológico e a emissão do resultado. Mesmo existindo a necessidade de controle de todo este processo através de mecanismos de avaliação da qualidade, a automação proporciona confiabilidade, com maior sensibilidade e eficiência no processo (FELDER et al., 2000).

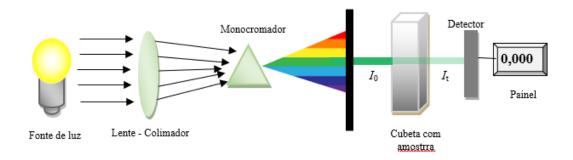
Apesar de existirem metodologias analíticas já estabelecidas no mercado que produzem resultados laboratoriais confiáveis, a busca por novos métodos de diagnóstico é constante tendo vários objetivos, entre eles agilidade no processo, preservação do meio ambiente, utilização mínima de espécime diagnóstico e sua conservação, além da busca pela otimização de recursos financeiros (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2016).

No desenvolvimento de tecnologias e processos, pesquisas são constantemente realizadas e conhecimentos adquiridos sobretudo quando se observa o processo no seu conjunto. Assim, somando-se os conhecimentos multisetoriais, adquiridos através da junção pesquisas bioquímica, química, física e exatas foi possível o advento de diversas metodologias analíticas que têm sido utilizadas ou testadas para utilização em diagnóstico clínico (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2016).

# 2.5 Metodologia preconizada para análise de componentes bioquímicos – espectrofotometria

As dosagens de elementos bioquímicos séricos foram submetidas a diversos avanços tecnológicos, permeando desde a técnica manual de preparação da amostra e utilização de espectrofotômetros, passando por analisadores semiautomáticos a totalmente automatizados até chegar ao acesso randômico, leitores de código de barras e interfaceamento de resultados. Mesmo com toda tecnologia empregada nas dosagens, a principal metodologia utilizada é a espectrofotometria, que apesar de ser amplamente utilizada apresenta algumas desvantagens, tais como excesso de resíduos líquidos e sólidos, não linearidade da reação em altas concentrações, interferência por hemólise, lipemia e hiper bilirrubinemia, além do que a amostra utilizada não pode ser reaproveitada depois da análise (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2016).

O princípio da espectrofotometria é baseado na determinação da concentração de elementos químicos e bioquímicos a partir da absorção e/ou emissão de luz por uma solução, já que ao haver incidência de luz com comprimento de onda na região do visível (350 a 750 nm) em uma solução contendo um absorvedor, a intensidade de luz incidente ( $I_0$ ) na solução é maior que a intensidade de luz transmitida pela solução ( $I_t$ ), ou seja, parte da luz incidida é absorvida pela amostra (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2016). Esta metodologia obedece ao princípio da Lei de *Beer-Lambert*, dado que a absorção de luz pela amostra é diretamente proporcional à concentração do analito presente nesta solução e está descrita conforme Figura 1 (NEPOMUCENO; RUGGIERO, 2004).



**Figura 1.** Esquema simplificado da espectrofotometria.

Fonte: Nepomuceno; Ruggiero, 2004.

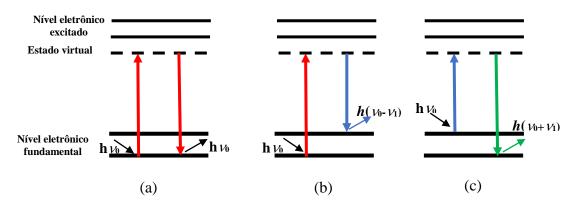
#### 2.6 Metodologia proposta para análise bioquímica – espectroscopia Raman

Átomos e moléculas podem absorver ou emitir energia em determinado comprimento de onda do espectro eletromagnético quando excitados por uma fonte luminosa, permitindo assim, o fornecimento de informações sobre a composição química dos elementos presentes na amostra bem como sua caracterização, elucidação estrutural e identificação de estruturas químicas (SANTOS et al., 2019). Fenômenos distintos podem ocorrer de acordo com a região no espectro eletromagnético (comprimento de onda) da luz incidida na amostra.

Com a utilização da radiação óptica iluminando uma amostra, fenômenos distintos podem ser observados de acordo com a região do espectro eletromagnético em

que o comprimento de onda se encontra. Com excitação no ultravioleta ou visível pode ocorrer mudança no nível de energia dos elétrons, levando a mudanças de órbitas; já a utilização da radiação infravermelha pode levar a interações com os níveis de energia vibracionais das moléculas. As interações decorrentes do processo de absorção modificam o momento de dipolo das moléculas, causando a diminuição da quantidade de fótons que deixam o material após a excitação. Já as interações decorrentes do processo de polarização molecular promovem o espalhamento da radiação em todas as direções sendo uma pequena porção da radiação espalhada de maneira inelástica, ou seja, com comprimento de onda (frequência) diferente do incidente, decorrente da modulação da frequência de excitação pelas energias das vibrações dos elementos químicos ou moléculas (FARIA; AFONSO; EDWARDS, 2002; SANTOS et al., 2019).

Ao haver interação da radiação monocromática com as moléculas de uma amostra, ocorre excitação da molécula, que sai de seu estado fundamental para um estado virtual intermediário, retornando ao estado fundamental cerca de  $10^{-6}$  a  $10^{0}$  ms após a excitação. Este retorno ao estado fundamental pode ocorrer de três formas distintas: a primeira em que a energia,  $h \nu_0$ , é conservada, ou seja, a radiação apresenta a mesma energia antes e após a sua interação com a molécula (espalhamento elástico ou Rayleigh); nas outras duas formas, quando a molécula retorna de seu estado virtual para o fundamental, o nível energético da mesma pode ser menor,  $h(\nu_0-\nu_1)$  (espalhamento inelástico Stokes) ou maior,  $h(\nu_0+\nu_1)$  (espalhamento inelástico anti-Stokes) se comparado ao seu estado energético inicial (Figura 2) (SANTOS et al., 2019).



**Figura 2.** (a) Espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes).

Fonte: Santos et al., 2019.

Quando a energia espalhada é diferente da incidida é observado o espalhamento inelástico ou Raman (frequência ou comprimento de onda da luz espalhada é diferente da luz incidente), ou seja, quando além da direção também ocorre alteração no comprimento de onda incidente. Já quando a luz espalhada tem a mesma energia da incidida, ocorrendo apenas alteração na direção do fóton, ocorre o espalhamento elástico ou Rayleigh (COLOMBAN; GOUADEC, 2009).

A espectroscopia Raman é, então, uma técnica de espectroscopia molecular que se baseia na interação da luz com a matéria para determinar a constituição ou composição de um material, cuja eficiência do espalhamento da luz por moléculas é proporcional à quarta potência da frequência de excitação. As informações obtidas na utilização desta espectroscopia são resultado de um processo de difusão de luz, de uma radiação incidente em uma molécula polarizável que, ao espalhar-se, carrega informação da energia de vibração molecular (espalhamento Raman) (PARKER, 1983; BUCKLEY; HANLON et al., 2000; RYDER, 2017).

Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia, publicou em 1928 no *Indian Journal of Physics*, seu primeiro artigo demonstrando resultados que comprovavam a existência do efeito de espalhamento inelástico (mais tarde nomeado espalhamento Raman). No estudo foi utilizado um espectrógrafo de quartzo, que era capaz de fotografar o espectro da luz espalhada e medir seu comprimento de onda (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1998). O físico indiano observou que quando havia incidência de um feixe de luz monocromático em uma amostra, a maior parte da luz emergente apresentava o mesmo comprimento de onda do feixe incidente, ou seja, apresentava a mesma cor, sendo denominada luz difusa de Rayleigh, porém ele demonstrou que em uma quantidade muito pequena, aproximadamente um em um milhão de fótons espalhados, havia uma mudança na direção da radiação e que, além da radiação que incidia, também havia outras com pequenas alterações, ou seja, variava a direção devido à variação do comprimento de onda da radiação incidente, e com isto a cor espalhada era diferente da cor incidente (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1998; COLOMBAN; GOUADEC, 2009; SANTOS et al., 2019).

Com base no espalhamento Raman torna-se possível a obtenção de diversas informações relevantes sobre a composição química da amostra na qual houve

incidência da luz, fornecendo características em nível molecular, podendo identificar tipos de ligações químicas, conformações moleculares e grupos funcionais de uma estrutura química (TALARI et al., 2014; SANTOS et al., 2019).

Entre as vantagens da espectroscopia Raman está a capacidade de detecção sem que seja necessário qualquer tipo de tratamento ou adição de reagentes, além de ser reprodutível e não degradar ou destruir a amostra, podendo assim ser utilizada *in situ* ou *in vitro* (FARIA, AFONSO e EDWARDS, 2002). Entre as limitações estão a ocorrência da fluorescência e a baixa intensidade do sinal espalhado, ademais não permite o estudo de metais, íons e não detecta elementos em baixíssima concentração (traços) (FARIA; AFONSO; EDWARDS, 2002).

#### 2.7 Ferramentas estatísticas utilizadas para a análise dos espectros

Os métodos qualitativos de análise univariada e multivariada vêm sendo frequentemente utilizados em estudos da área da saúde (como medicina, biologia e química), principalmente por aqueles que têm como objetivo identificar fatores associados a determinadas respostas de interesse, uma vez que são uma alternativa atraente para a análise quantitativa e fornecem mais informações sobre a amostra (PAES, 2010; FERNANDES, 2016).

Métodos univariados, métodos multivariados e métodos multidimensionais são as classificações existentes entre os métodos qualitativos. Os assim denominados univariados são utilizados quando o objetivo é investigar isoladamente a relação entre cada variável explicativa e a variável resposta, sem levar em conta as demais. A análise multivariada é mais conhecida como uma série de técnicas que visa analisar conjuntamente grupos de variáveis em diferentes contextos, enquanto os métodos multidimensionais podem ser obtidos a partir do uso de técnicas analíticas hifenadas (PAES, 2010; FERNANDES, 2016).

## 2.7.1 Quantificação, discriminação e classificação através de ferramentas estatísticas

Técnicas quimiométricas multivariadas são úteis para determinação da concentração ou classificação de elementos bioquímicos através de características

espectrais, já que extraem informações relevantes dos mesmos (múltiplas variáveis – múltiplos picos Raman) por intermédio da associação de matemática, estatística e programação (BRERETON et al., 2018). Usualmente, o termo é utilizado para se referir a modelos de regressão múltipla que buscam explicar uma variável resposta com base em um conjunto de variáveis explicativas. Quando o interesse é avaliar a influência de um conjunto de fatores sobre doenças, eventos ou outras características, os métodos estatísticos mais utilizados são os modelos de regressão, os quais estabelecem uma equação entre a resposta de interesse e os fatores que se deseja investigar (PAES, 2010).

PLS e PCA são algoritmos de regressão utilizados para a análise multivariada de dados, já que são dois métodos estatísticos que permitem discriminação e quantificação de dados utilizando diversas variáveis simultaneamente (regressão PLS e PCR) (LEHMANN; FISHER; NEYMAN–PEARSON, 1993; GOITZ et al.,1995; BRERETON et al., 2018).

Os métodos multivariados PCA e PLS são ferramentas estatísticas utilizadas para redução da dimensionalidade de dados multivariados, através da seleção de informações pela similaridade ou diferença, em que variáveis que apresentam grande correlação são organizadas em novas variáveis, resultando em um conjunto de dados composto somente de informações importantes (BRERETON et al., 2018).

Na etapa de calibração destes modelos, ocorre a validação cruzada, que abrange diversas técnicas de validação de modelos estatísticos para avaliar os resultados de uma análise para um conjunto de dados independentes, ou seja, através de dados conhecidos acontece o treinamento e execução do modelo que então se aplica ao conjunto de dados desconhecidos, testando assim a capacidade do modelo prever novos dados. Entre as técnicas de validação cruzada destaca-se a validação cruzada exaustiva, a partir da qual todas as formas possíveis de dividir a amostra original e um conjunto de treinamento são testadas, como exemplo a validação cruzada *leave-one-out*, em que uma das amostras é excluída para ser testada pelo modelo matemático desenvolvido com as *n*-1 amostras restantes. As variáveis da regressão PCA e PLS são então usadas para estimar a concentração na amostra deixada de fora, e não exaustiva, em que não são testadas todas as formas de treinamento, como exemplo os métodos *holdout*, nos quais o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos, sendo um para treinamento e outro para testagem ou validação, e o *k*-fold, onde os dados são divididos em diversos

subconjuntos do mesmo tamanho, sendo um subconjunto destinado à utilização para o treino e o restante para o teste (ALLEN, 2012).

#### 2.7.2 PCA

A PCA é um modelo matemático relacionado com o conceito de redução do volume e simplificação da descrição do conjunto de dados, identificando padrões nas informações com apresentação através do realce de suas diferenças e semelhanças. Com a identificação de padrões é então possível a redução da dimensionalidade, sem perda de informações, extraindo dados importantes e mantendo as variáveis mais relevantes (ESPIRITO SANTO, 2012).

Assim sendo, a PCA é uma técnica de análise multivariada de dados que permite a construção de um índice com combinações lineares com máxima variância, para isso é necessário que se contenha o máximo de informações pelo conjunto de variáveis selecionadas (SANDANIELO, 2008). O objetivo principal da PCA é substituir as variáveis originais por um número menor de variáveis, proporcionando uma transformação ortogonal das variáveis originais para um conjunto de novas variáveis, denominados de componentes principais. Destarte, a PCA permite a identificação de padrões e a redução da dimensionalidade, sem que haja perda de informações e mantendo as variáveis mais relevantes (ESPIRITO SANTO, 2012). Com isto, a PCA agrupa informações do conjunto de dados de acordo com a variação de suas características (GROMSKI et al., 2015).

Os componentes principais são conjuntos de variáveis que apresentam quantidades menores ou iguais das variáveis originais, cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados, apresentando a intenção de preservar o máximo de informações contidas nos dados, reduzindo a dimensionalidade das variáveis e agrupando os dados pelas similaridades sem que haja perda de informações (HONGYU, 2015; ANZANELLO, 2013).

#### 2.7.3 PLS

A metodologia do modelo matemático PLS (mínimos quadrados parciais), do inglês *Partial Least Squares*, gera um número reduzido de combinações lineares independentes das variáveis de processo. É uma metodologia utilizada em situações em que variáveis de processo apresentam elevados níveis de correlação, ruído, observações faltantes e desbalanço na proporção de variáveis e de observações (ANZANELLO, 2013).

Este modelo relaciona uma ou mais variáveis espectrais com um descritor (concentrações ou agrupamentos, por exemplo), buscando a correlação entre elas. Com o modelo PLS espera-se obter maior covariância, ou seja, identificar a inter-relação entre as variáveis aleatórias e o descritor, quer dizer, entre uma matriz independente (*x*, espectros) e uma matriz dependente (*y*, concentrações ou agrupamentos) (GROMSKI et al., 2015).

A PLS tem sido empregada em modelos com grande número de variáveis e altamente correlacionadas, elevados níveis de ruído e desequilíbrio entre o número de variáveis e observações, sendo que seleciona a relação entre as variáveis dependentes e independentes por meio de um reduzido número de combinações lineares de ambas as variáveis, o que simplifica e facilita a utilização dos dados e remoção de dados consideráveis (ZIMMERA; ANZANELLOB, 2014).

Em qualquer um dos métodos, as informações espectrais mais importantes são concentradas nas primeiras variáveis, diminuindo a dimensão do conjunto de dados com a manutenção da informação relevante que representa o conjunto espectral (COOPER, 1999). Ambos têm a intenção de favorecer a extração de dados das medidas coletadas, controlando ao mesmo tempo múltiplas variáveis do espectro (GROMSKI et al., 2015).

### 3 METODOLOGIA

Para facilitar a compreensão da pesquisa, a Figura 3 esquematiza as fases às quais as amostras de sangue e os espectros obtidos foram submetidos, iniciando pela coleta das amostras, passando pela análise espectroscópica Raman, seguida pelo tratamento estatístico, determinação da concentração e discriminação entre grupos normais e alterados dos elementos bioquímicos em estudo.

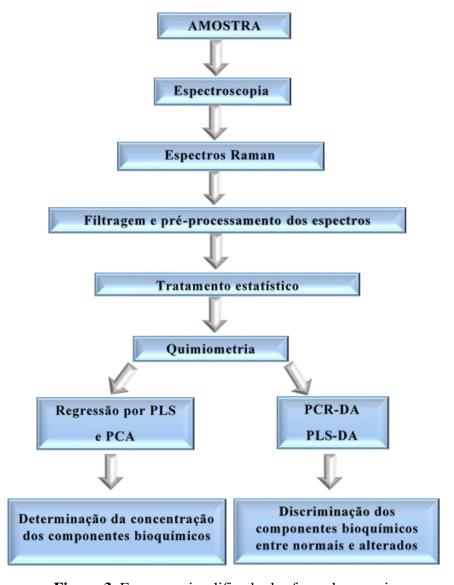


Figura 3. Esquema simplificado das fases da pesquisa.

### 3.1 Comitê de ética em pesquisa

Esta pesquisa foi realizada de acordo com princípios éticos e normas regulatórias para pesquisas envolvendo seres humanos, atendendo aos requisitos da Resolução No. 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde (RDC 466, 2012), tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi – UAM, São Paulo, SP, Brasil, CAAE 70190117.1.00005492.

### 3.2 Amostras de soro

Para o experimento foram utilizadas amostras de soro previamente analisadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Oswaldo Cruz (São José dos Campos, SP), utilizando o analisador espectrofotométrico COBAS 6000 (Roche/Hitachi, Indianapolis, IN, EUA). Foram aleatoriamente selecionadas 242 amostras da rotina ambulatorial com valores determinados para um ou mais dos analitos que seguem: colesterol total (COL), triglicerídeo (TRI), lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol), ureia (URE), creatinina (CRE) e glicose (GLI). Alíquotas de 200 μL de soro foram acondicionadas em Eppendorf e mantidas sob temperatura de -6 °C por 2 dias, sendo após este prazo analisadas pela espectroscopia Raman. Como nem todas as amostras tiveram todos os elementos bioquímicos analisados, houve pequena diferença no total de amostras analisadas para cada componente bioquímico.

Para os reagentes utilizados pelo analisador Cobas 6000, que são específicos para cada analito de interesse, o coeficiente de correlação linear (r) foi obtido a partir da comparação das dosagens entre equipamentos com a mesma metodologia (espectrofotometria), com intervalo de concentração definidos e um determinado número de amostras, que é diferente para cada elemento bioquímico (Tabela 1) (ROCHE DIAGLOG, 2020).

**Tabela 1.** Coeficiente de correlação linear (*r*) dos reagentes utilizados na determinação da dosagem dos componentes plasmáticos por espectrofotometria nos intervalos de concentração especificados e equipamentos/acessórios utilizados para sua determinação.

Componente	r	Equipamentos comparados	No.	Intervalo de
plasmático			amostras	concentração das
			analisadas	amostras analisadas
Colesterol	0,997	Roche/Hitachi Cobas C 501	154	59,1 – 715 mg/dL
total		Roche/Hitachi 917		
Triglicerídeo	1,0	Roche/Hitachi Cobas C 701	80	$19,5-792\ mg/dL$
		Roche c 501		
HDL	0,999	Roche/Hitachi Cobas C 501	75	$12,\!4-114~\text{mg/dL}$
Colesterol		Roche/Hitachi Modular P		
Ureia	0,998	Roche/Hitachi Cobas C 501	175	13,6 - 237  mg/dL
		Roche/Hitachi 917/Modular P		
Creatinina	0,999	Roche/Hitachi Cobas C 501	273	0,429 - 24,6  mg/dL
		Roche/Hitachi 917/Modular P		
Glicose	0,999	Roche/Hitachi 717	154	7.0-558  mg/dL
		Roche/Hitachi 917		

Fonte: Roche Diaglog, 2020.

### 3.3 Espectroscopia Raman

A análise das amostras de soro por espectroscopia Raman foi realizada em laboratório de espectroscopia Raman da Universidade Anhembi Morumbi (São José dos Campos, SP) com ambiente controlado (temperatura de 24 °C e umidade de 60 %), com atendimento às normas de biossegurança e controle de infecção. As amostras foram pipetadas em triplicata em um suporte de alumínio com orifícios de aproximadamente 80 μL conforme descrito por Silveira et al. (2017).

### 3.3.1 Obtenção do espectro Raman

Os espectros Raman das amostras de soro foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P-1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), com

excitação no infravermelho próximo (830 nm, 350 mW), e a coleta do espectro Raman das amostras no porta amostras foi feita com auxílio de uma sonda Raman (modelo *Vector Probe, Lambda Solutions Inc.*). O espectrômetro é composto por um espectrógrafo compacto (## 1/8, 1200 linhas/mm) para a dispersão da luz e uma câmera CCD (*back-thinned*, *deep-depleted*, 1320x100 *pixels*, refrigerada por *Peltier* a -75 °C) para a conversão do sinal óptico em sinal elétrico, resultando em espectros com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> no centro da faixa espectral entre 400 e 1800 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram adquiridos e armazenados utilizando um microcomputador e *software* (*RamanSoft* versão 2.0, *Lambda Solutions Inc.*), com parâmetros de aquisição de cada espectro (5 s de exposição e 10 acumulações), que resultam em espectros com relação sinal-ruído maior que 15 medidos na faixa espectral de 1400 a 1500 cm<sup>-1</sup> (BISPO et al., 2013; BORGES et al., 2015; SAATKAMP et al., 2016). Assim, a calibração prévia do espectrômetro foi realizada utilizando-se bandas Raman conhecidas do naftaleno na região de 600 a 1800 cm<sup>-1</sup> (SILVEIRA et al., 2002).

### 3.3.2 Filtragem e pré-processamento dos espectros

A etapa de filtragem tem por finalidade proporcionar a redução de interferentes decorrentes do processo de aquisição dos espectros assim como maximizar os sinais obtidos para posterior análise. Na filtragem ocorreu a retirada do ruído de alta frequência com o emprego de um filtro *Savitzky-Golay* de ordem 2 e 11 pontos de interpolação, a correção de cada espectro pela resposta em intensidade do espectrômetro, seguida da remoção da fluorescência de fundo aplicando-se um polinômio de ordem 7 e ajustada na região de 400-1800 cm<sup>-1</sup> (BISPO et al., 2013; BORGES et al., 2015). A etapa de pré-processamento dos espectros consistiu na normalização pela área sob a curva (norma 1 ou norma *taxicab*) proporcionando correção de linha de base (BISPO et al., 2013; BORGES et al., 2015).

Os dados espectrais (espectro médio de cada amostra) foram separados em dois grupos: concentração normal (referência) e concentração alterada, de acordo com a concentração determinada pelo Laboratório Oswaldo Cruz para cada analito através de ensaio colorimétrico (Tabela 2). A estes dois grupos foi aplicado o teste t de Student (p.< 0,01) nas intensidades de cada um dos picos Raman com a intenção de verificar em

quais picos houve diferenciação entre os grupos com concentrações normal e alterada. O nível de significância do teste *t* para rejeitar a hipótese nula (igualdade entre as intensidades médias dos grupos normal e alterado) foi de 1%, ou seja, mostrando quais pontos espectrais contribuem 99% (nível de confiança) para confirmar se a variável utilizada na regressão realmente contribui para a variável (LEHMANN; FISHER; NEYMAN-PEARSON, 1993).

Como a coleta dos espectros Raman em cada amostra de soro foi realizada em triplicata, foi obtido o triplo de espectros em relação ao número de amostras para cada elemento bioquímico, e, posteriormente calculado o espectro médio de cada amostra, sendo a média utilizada na análise dos dados, resultando na quantidade de espectros para cada componente bioquímico plasmático analisado conforme Tabela 2.

**Tabela 2**. Valores de referência estabelecidos para colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose em soro sanguíneo humano, número de amostras classificadas como normal e alterada conforme o valor de referência, total de amostras e total de espectros obtidos a partir das amostras.

Componente	Valor de	No. de amostras com	No. de amostras com	Total de
plasmático	referência	concentração de	concentração alterada	amostras
	(mg/dL)	referência e intervalo	e intervalo de	analisadas
		de concentração das	concentração das	
		amostras (mg/dL)	amostras (mg/dL)	
Colesterol Total	< 190**	136 (103 – 189)	105 (191 – 301)	241
Triglicerídeo	< 150**	165 (22 – 150)	76 (151 – 568)	241
HDL colesterol	> 40**	185 (41-134)	55 (26-40)	240
Ureia	< 50*	231 (11 – 50)	9 (51 – 114)	240
Creatinina	< 1,3*	237 (0,31 – 1,23)	5 (1,39 – 2,89)	242
Glicose	70 – 99**	174 (75 – 99)	65 (100 – 258)	239

Fonte: \*\*Johnson et al., 2004;\* Stone et al., 2013.

## 3.4 Regressão quantitativa dos elementos bioquímicos (colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose) por métodos multivariados

O algoritmo utilizado para a análise multivariada de dados é baseado na PCA e PLS a partir da rotina Chemoface (http://www.ufla.br/chemoface) (NUNES et al., 2012), sendo utilizados os espectros médios obtidos em cada amostra e as concentrações dos elementos bioquímicos alcançados por meio da metodologia referência (espectrofotometria). A regressão quantitativa ocorreu por meio dos algoritmos PLS e PCR na rotina Chemoface, sendo empregado o método de validação cruzada *leave-one-out*, em que uma amostra é retirada e o modelo criado é testado nessa amostra deixada de fora, obtendo-se a concentração dos elementos bioquímicos nesta amostra (concentração prevista ou estimada); o modelo é então repetido *n* vezes e aplicado sucessivamente com todas as amostras.

## 3.5 Classificação das amostras de soro contendo os elementos bioquímicos (colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose) por métodos multivariados de discriminação PCA (PCR-DA) e PLS (PLS-DA)

Através das diferenças nas características espectrais do soro em função das concentrações dos analitos de interesse, utilizando a rotina Chemoface, os espectros foram classificados em grupos com concentrações normais ou alteradas destes analitos (GOITZ et al.,1995), em que os métodos multivariados de discriminação PCR-DA (PCA discriminante) e PLS-DA (PLS discriminante) foram utilizados para classificação de padrões, sendo as variáveis preditas classificadas como "1" para indicar elementos pertencentes a uma classe (normal), e "2" para elementos fora da classe (alterada) (MESCHER, 2013). Para a discriminação, além da utilização da rotina Chemoface, também houve a observação das concentrações previstas por PLS e PCA com posterior comparação com as concentrações obtidas do método de referência através de observação dos resultados em planilha de Excel.

#### 3.6 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos utilizados para a comparação da espectrofotometria com a espectroscopia Raman foram sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), prevalência real, prevalência estimada, classificação correta (precisão), classificação incorreta e coeficiente de Kappa.

Para a determinação destes parâmetros foram utilizados os resultados expressos por meio de agrupamentos de concentrações normais ou alterados, ou seja, os alcançados por regressão PLS, PCR ou pela classificação dos grupos através da observação das concentrações obtidas pelos modelos PLS e PCA por intermédio da rotina Chemoface. Considerando-se que um teste bioquímico quantitativo pode ser considerado positivo (alterado) ou negativo (normal), ele pode ter quatro interpretações, em que duas estão corretas e duas estão incorretas, conforme se segue (STRALEN et al., 2009; ENUE; GEORGIADIS; JOHNSON, 2000):

- teste correto quando positivo na presença do aumento da concentração do elemento bioquímico ou resultado verdadeiro positivo (VP);
- teste correto quando negativo na ausência do aumento da concentração do elemento bioquímico ou verdadeiro negativo (VN);
- teste incorreto quando positivo na ausência do aumento da concentração do elemento bioquímico ou teste falso positivo (FP);
- teste incorreto quando negativo na presença do aumento da concentração do elemento bioquímico ou teste falso negativo (FN);

A Tabela 3 representa a distribuição dos resultados conforme descrito e é adaptada do esquema de validação de testes imunológicos, em que para a presença de doença considera-se a concentração alterada do elemento bioquímico (ENUE; GEORGIADIS; JOHNSON, 2000; STRALEN et al., 2009).

**Tabela 3.** Representação dos resultados e interpretações de um teste para diagnóstico adaptada para análise de elementos bioquímicos séricos.

Resultado	Concentração alterada do elemento bioquímico sérico			
	Presente	Ausente		
Alterado (positivo)	VP	FP		
Normal (negativo)	FN	VN		

Fonte: Enue; Georgiadis; Johnson, 2000; Stralen et al., 2009.

Assim, a partir da interpretação dos resultados é possível calcular os parâmetros analíticos sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), prevalência real, prevalência estimada, classificação correta (precisão), classificação incorreta e coeficiente de Kappa, conforme cálculos demonstrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Fórmulas para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), prevalência real, prevalência estimada, classificação correta (precisão), classificação incorreta e coeficiente de Kappa.

Parâmetro analítico	Fórmula		
Sensibilidade	VP/(VP+FN)		
Especificidade	VN/(FP+VN)		
VPP	VP/(VP+FP)		
VPN	VN/(FN+VN)		
Prevalência real	(VP+FN)/N		
Prevalência estimada	(VP+FP)/N		
Classificação correta (precisão)	(VP+VN)/N		
Classificação incorreta	(FP+FN)/N		
Coeficiente de Kappa	(Po–Pe)/(1–Pe)		
	Onde, Po = $(VP+VN)/N$ ;		
	Pe = [(VP+FP).(VP+FN)] + [(FN+VN).(FP+VN)]/N		

VP (verdadeiro positivo); FN (falso negativo); VN (verdadeiro negativo); FP (falso positivo); N (número total de amostras); Po (taxa de aceitação relativa); Pe (taxa de aceitação hipotética).

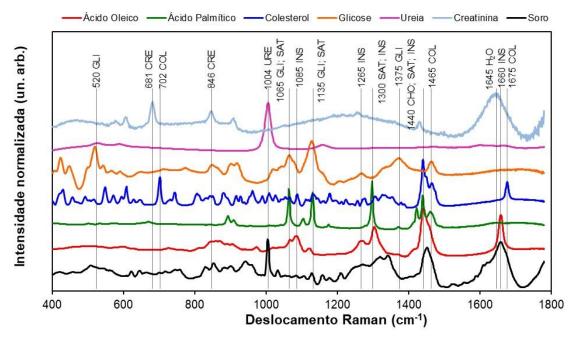
Fonte: Enue; Georgiadis; Johnson, 2000; Sim; Wright, 2005; Stralen et al., 2009.

#### 4 RESULTADOS

### 4.1 Espectro Raman do soro, picos e atribuições baseadas nos constituintes bioquímicos e na literatura

O sangue humano é composto pelo plasma, porção líquida que corresponde a 55 % do volume sanguíneo, e pela porção sólida composta por elementos celulares (hemácias, leucócitos e plaquetas). O plasma é constituído em sua maior parte por água (92 %), na qual estão imergidas proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, e também nutrientes, gases respiratórios, eletrólitos, hormônios, fatores de coagulação, sais minerais, ácidos graxos, vitaminas, enzimas e elementos bioquímicos, tais como glicose, colesterol total, triglicerídeo, albumina, ureia, creatinina, glicose, ácido úrico (MESCHER, 2013).

A Figura 4 apresenta o espectro médio do soro humano das 242 amostras analisadas e os espectros Raman de alguns de seus constituintes (colesterol total, glicose, ureia e creatinina) e ácidos graxos (ácido oleico – insaturado e palmítico – saturado) na faixa espectral entre 400 e 1800 cm<sup>-1</sup>, os quais foram utilizados para identificar a possível presença dos picos destes constituintes nos espectros dos soros com concentrações alteradas (BISPO et al., 2013; SILVEIRA et al., 2017). Os picos mais intensos identificados na Figura 4 e nos demais espectros relacionados no texto apresentam uma tentativa de atribuição vista na Tabela 5 e que é baseada na literatura recente (HANLON et al., 2000; KRAFTT et al., 2005; DINGARI et al., 2012; BISPO et al., 2013; TALARI et al., 2014; LYKINA; ARTEMEYEV; BRATCHENKO, 2017;).



**Figura 4.** Espectro Raman do soro humano e espectros Raman dos constituintes basais colesterol, ácidos oleico e palmítico (que possuem bandas espectrais características de lipídios), glicose (GLI), ureia (URE) e creatinina (CRE). Os picos 702, 1440, 1465 e 1675 cm<sup>-1</sup> são característicos de colesterol (COL); os picos 1065, 1135, 1300 e 1440 cm<sup>-1</sup> são característicos de ácidos graxos saturados (SAT); os picos 1085, 1265, 1300 e 1660 cm<sup>-1</sup> são característicos de ácidos graxos insaturados (INS); o pico 1004 cm<sup>-1</sup> é característico de ureia; os picos 681 e 846 cm<sup>-1</sup> são característicos de creatinina; e os picos em 520, 1065 e 1135 cm<sup>-1</sup> são característicos de glicose (GLI). O espectro sérico apresenta outros picos além dos já citados e reflete sua composição em proteínas (principalmente albumina) e outros metabólitos.

Fonte: Bispo et al., 2013; Silveira et al., 2017.

Na Figura 4, os picos Raman relativos à albumina, que apresenta alta concentração em relação aos demais componentes bioquímicos séricos (DREES; WU, 2010; DINGARI et al., 2012; TALARI et al., 2014; LYKINA; ARTEMEYEV; BRATCHENKO, 2017), podem ser claramente visualizados a partir dos picos de bandas referentes a proteínas em 1004 cm<sup>-1</sup> [estiramento do anel aromático ("respiração") – fenilalanina], faixa entre 1100-1350 cm<sup>-1</sup> (amida III), em 1450 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>) e 1660 cm<sup>-1</sup> (amida I) (DINGARI et al., 2012; TALARI et al., 2014; LYKINA; ARTEMEYEV; BRATCHENKO, 2017). Nota-se que, apesar de os picos da

albumina dominarem o espectro do soro, é possível determinar pontos e/ou bandas espectrais onde a diferença entre os espectros médios das amostras com valores normais (referência) e alterados (Figuras 5 a 10) é relevante (teste t, p < 0,01), sugerindo presença dos elementos bioquímicos que caracterizam cada grupo (Tabela 5).

Observa-se, também, na Tabela 5, que picos atribuídos à glicose estão bastante próximos de picos atribuídos a lipídeos, podendo haver sobreposição de elementos com maior concentração em relação ao de menor concentração sérica, a glicose. A exemplo disto, o pico 520 cm<sup>-1</sup> (glicose) e 555 cm<sup>-1</sup> (colesterol); 859 cm<sup>-1</sup> (glicose) e 877 cm<sup>-1</sup> (ácidos graxos insaturados); 1130 cm<sup>-1</sup> (glicose) e 1135 cm<sup>-1</sup> (ácidos graxos insaturados); e 1375 cm<sup>-1</sup> (glicose) e 1440 cm<sup>-1</sup> (colesterol, ácidos graxos saturados e insaturados) (TALARI et al., 2014; BORGES et al, 2015).

**Tabela 5.** Atribuições dos picos com diferença estatisticamente significativa nos espectros Raman do soro com concentração normal (referência) e alterada conforme Figuras 5 a 10 e referências correspondentes às atribuições das vibrações moleculares

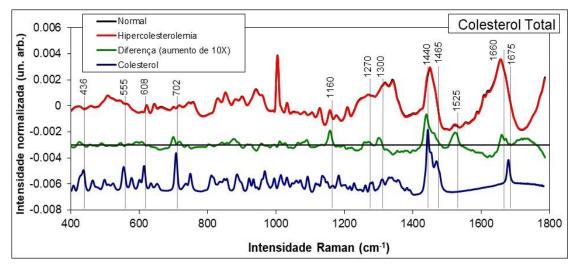
Posição do pico (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição			
426 e 436	Colesterol			
520	Glicose			
555	Colesterol			
608	Colesterol			
681	Creatinina			
702	Colesterol			
846	Creatinina			
859	Glicose			
877	Ácidos graxos insaturados			
919	Glicose			
1004	Proteína (albumina), ureia			
1065	Ácidos graxos saturados, glicose			
1085	Ácidos graxos insaturados			
1130	Glicose			
1135	Ácidos graxos insaturados			
1160	Carotenoide			
1265	Ácidos graxos insaturados			
1270	Ácidos graxos insaturados			
1300 e 1305	Ácidos graxos saturados e insaturados			
1375	Glicose			
1440	Colesterol, ácidos graxos saturados e insaturados			
1465	Colesterol, Lipídios			
1525	Carotenoide			
1660	Ácidos graxos saturados			
1675	Colesterol			

Fonte: Felder et al., 2000; Hanlon et al., 2000; Kraftt et al., 2005; Dingari et al., 2012; Bispo et al., 2013; Talari et al., 2014; Borges et al., 2015; Saatkamp et al., 2016.

### 4.2 Diferenças entre espectros médios das amostras com resultados normais e alterados

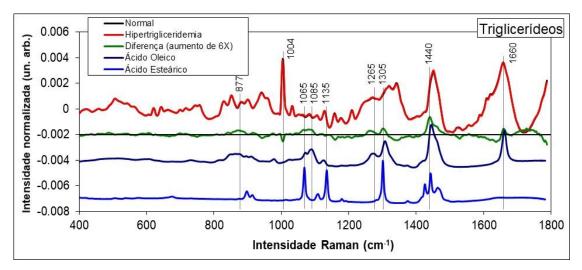
Embora os picos de albumina dominem o espectro do soro, a diferença entre o espectro médio do grupo normal (referência) e o alterado pode mostrar a presença do composto bioquímico que caracteriza cada grupo. O teste t de Student foi aplicado comparando a intensidade de cada Raman dos grupos normal (referência) e alterado de cada bioquímico, e os picos com valor de p significativo (teste t, p < 0,01) foram marcados e correlacionados tanto com os espectros das diferenças bem como com o espectro do referido bioquímico (que é alterado naquele grupo) para confirmar a posição dos picos anotados, verificando se a variável utilizada na regressão realmente contribui para a diferenciação (Figuras 5 a 10).

A Figura 5 apresenta os espectros médios normalizados de 241 amostras de soro humano a partir dos quais o colesterol total foi avaliado e a diferença entre os espectros normal e aumentado (espectro com aumento de 10X) revelou picos em 436, 555, 608, 702, 1440, 1465, 1660 e 1675 cm<sup>-1</sup>, com intensidades maiores para o grupo hipercolesterolêmico (teste t, p < 0,01) e relacionados com os picos Raman do colesterol (TALARI et al., 2014; BORGES et al., 2015), picos em 1270 e 1300 cm<sup>-1</sup> atribuídos a lipídios. Destaca-se a presença dos picos em 1160 e 1525 cm<sup>-1</sup>, atribuídos a carotenoides, mais intensos no grupo hipercolesterolêmico (TALARI et al., 2014).



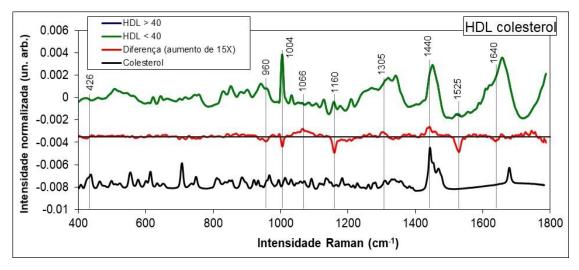
**Figura 5.** Espectros médios normalizados de 241 amostras de soro humano com concentrações normal e aumentada de colesterol total e a diferença entre os espectros com resultados normal e aumentado para colesterol total (espectro com aumento de 10X). Os picos marcados apresentam diferença estatisticamente significativa (teste t, p < 0,01) e podem ser atribuídos ao colesterol total. Os picos marcados com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa (teste t, p < 0,01) e podem ser atribuídos a carotenoides.

A Figura 6 apresenta os espectros normalizados de 241 amostras de soro humano onde o triglicerídeo foi avaliado e a diferença entre os espectros normal e aumentado para triglicerídeo (espectro com aumento de 6X) apresentou picos com maior intensidade para o grupo hipertrigliceridêmico em 877, 1065, 1085, 1135, 1265, 1305, 1440 e 1660 cm<sup>-1</sup> (teste *t*, *p* < 0,01) (TALARI et al., 2014; BORGES et al., 2015). Os espectros do ácido oleico (ácido graxo monoinsaturado) e ácido esteárico (ácido graxo saturado) também são mostrados na Figura 6, pois podem ser utilizados como referência para triglicerídeo (tri-éster resultante da ligação química entre três ácidos graxos) contendo ácidos graxos saturados e insaturados (TALARI et al., 2014; BORGES et al., 2015).



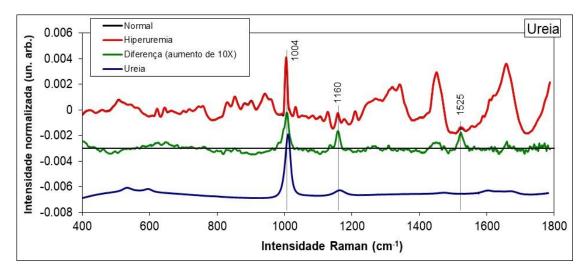
**Figura 6.** Espectros médios e normalizados de 241 amostras de soro humano com concentrações normal e aumentada de triglicerídeos, e diferença entre os espectros com resultado normal e aumentado para triglicerídeos (espectro com aumento de 6X), e espectros do ácido oleico e esteárico como estruturas químicas de referência basal para triglicerídeos. Os picos marcados apresentam diferença estatisticamente significativa (teste t, p < 0.01) e são característicos dos triglicerídeos.

Para o HDL colesterol, o espectro da diferença entre normal (> 40 mg/dL) e alterado (< 40 mg/dL) (espectro com aumento de 15X) (Figura 7) revelou picos positivos que estão relacionados à sua constituição lipoproteica em 1066,  $1305 \text{ e } 1440 \text{ cm}^{-1}$  para lipídios (teste t, p < 0,01), e picos negativos em 960, 1004 e 1640 (teste t, p < 0,01) para proteínas. Observou-se também, a presença dos picos negativos em 1004,  $1160 \text{ e } 1525 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a carotenoides (TALARI et al., 2014). A presença de picos de carotenoides negativos nos grupos com HDL alterado é um achado interessante, uma vez que se espera que alguns tipos de carotenoides séricos se correlacionem inversamente com o HDL colesterol (BARKER, 2003).

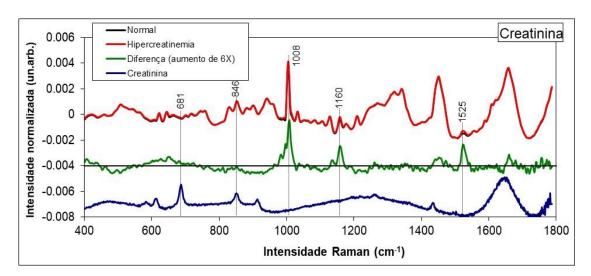


**Figura 7.** Espectros médios e normalizados de 240 amostras de soro humano com concentrações normal e alterada de HDL colesterol, e a diferença entre os espectros com resultado maior ou menor que 40 mg/dL (espectro com aumento de 15X). Os picos marcados representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste t, p < 0.01) e são característicos da fração HDL do colesterol. Os picos marcados com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa (teste t, p < 0.01) e podem ser atribuídos aos carotenoides.

As Figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, 240 e 242 amostras de soro humano e a diferença entre espectros normais e aumentados para ureia e creatinina, em que a principal diferença espectral entre as amostras normais e com valores aumentados de ureia (Figura 8) foi no pico em 1004 cm<sup>-1</sup> (teste t, p < 0,01), que é um pico característico da ureia (BISPO et al., 2013) e se sobrepõe ao pico dos carotenoides em 1006 cm<sup>-1</sup> (TALARI et al., 2014). Os demais picos também foram observados no espectro de diferença do grupo hiperuremia (1160 e 1525 cm<sup>-1</sup>), mas não apresentaram significância (teste t, p > 0,1). O mesmo ocorreu com a creatinina, cujo espectro de diferença exibiu pico significativo em 1006 cm<sup>-1</sup> (teste t, p < 0,01), apesar da presença de picos de carotenoides com intensidade não significativa em 1160 e 1525 cm<sup>-1</sup> (teste t, p > 0,1), e picos de creatinina em 681 e 846 cm<sup>-1</sup> (teste t, p = 0,02 e p = 0,1, respectivamente). A creatinina é encontrada em concentração muito baixa no sangue, consequentemente seus picos em 681, 846 e 910 cm<sup>-1</sup> (BISPO et al., 2013; TALARI et al., 2014) têm baixa intensidade no espectro do soro e nenhuma diferença significativa foi encontrada para esses picos.



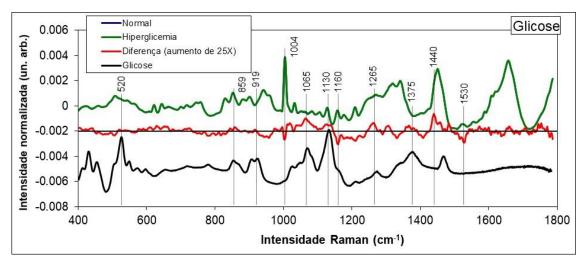
**Figura 8.** Espectros médios e normalizados de 240 amostras de soro humano com concentrações normal e aumentada de ureia, e a diferença entre os espectros com resultado normal e aumentada para ureia (espectro com aumento de 10X).



**Figura 9.** Espectros médios e normalizados de 242 amostras de soro humano com concentrações normal e aumentada de creatinina, e a diferença entre os espectros com resultado normal e aumentado de creatinina (espectro com aumento de 6X).

O espectro de diferença da glicose normal e alterada (Figura 10) apresentou picos com maior intensidade em 1065 e 1130 cm<sup>-1</sup> (teste t, p < 0,01), que são atribuídos a carboidratos (BISPO et al., 2013; TALARI et al., 2014; PLEBANI, 2016). Outro pico com diferença significativa no espectro de diferença está em 1265 cm<sup>-1</sup> (teste t, p < 0,01), e o pico com diferença não significativa em 1440 cm<sup>-1</sup> (teste t, p = 0,04) está

relacionado a lipídios. Picos negativos de carotenoide foram observados no espectro de diferença, mas sem significância. Apesar de não apresentar significância, a presença de picos positivos de lipídios e picos negativos de carotenoides no grupo da hiperglicemia é um achado interessante, uma vez que os lipídios estão diretamente e os carotenoides totais estão inversamente relacionados à síndrome metabólica.



**Figura 10.** Espectros médios e normalizados de 239 amostras de soro humano com concentrações normal e aumentada de glicose, e a diferença entre os espectros com resultado normal e aumentado de glicose (espectro com aumento de 25X).

### 4.3 Modelos quantitativos baseados em regressão PLS e PCA

As concentrações dos componentes bioquímicos no soro foram estimadas através de modelos espectrais baseados em regressão PLS (PLSR) e PCA (PCR) tomando como referência as concentrações determinadas por espectrofotometria. As concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol, ureia, creatina e glicose foram obtidas através do *software* Chemoface a partir das concentrações dos constituintes (obtidas pelo método padrão, consideradas variáveis independentes) e dos espectros (variáveis dependentes), em que se estimou a concentração por meio da validação cruzada *leave-one-out* (GOITZ et al.,1995). A partir das concentrações previstas das amostras *left-out*, foram calculados o erro quadrático médio da validação cruzada (RMSEcv), o coeficiente de determinação da validação cruzada (R<sup>2</sup>cv) e o

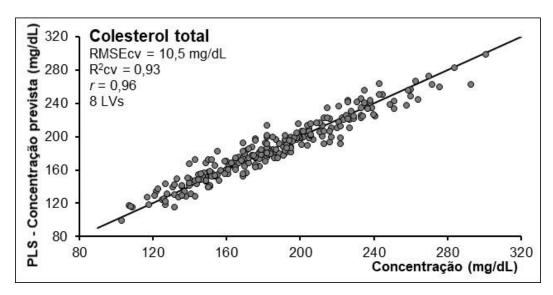
coeficiente de correlação linear (*r*) das concentrações previstas *versus* reais, que estimam o erro e o grau de relacionamento linear entre os resultados obtidos pelas metodologias PLS e PCA comparativamente ao método padrão (GOITZ et al.,1995).

Os valores de RMSEcv, R<sup>2</sup>cv, r e percentual de erro baseado na concentração estimada pelos modelos de regressão baseados na PLS e na PCA em relação ao valor máximo da concentração de cada elemento são demonstrados na Tabela 6. Os melhores resultados para a previsão das concentrações foram obtidos pelo modelo PLS nas amostras *left-out*, sendo apresentados nas Figuras 11 a 16, que representam as comparações entre a previsão do modelo PLS e a concentração referência obtida pelo método espectrofotométrico.

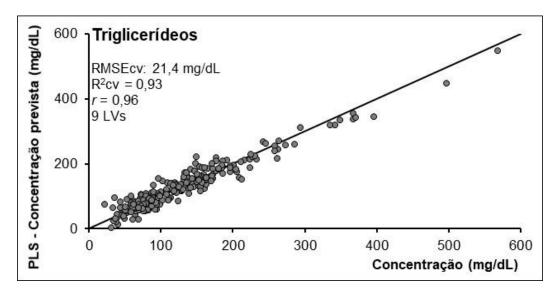
**Tabela 6.** Valores do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSEcv), do coeficiente de determinação da validação cruzada (R<sup>2</sup>cv), do coeficiente de correlação linear (*r*) e erro dos modelos de regressão PCR e PLS em relação a cada componente bioquímico do soro.

Parâmetros dos modelos de regressão								
Regressão baseada na PCA (PCR)								
Componente	No. de componentes	RMSEcv	R <sup>2</sup> cv	r	Erro (%)			
Colesterol total	5	24,1	0,62	0,79	8,0			
Triglicerídeos	4	45,0	0,67	0,82	7,9			
HDL	3	16,5	0,05	0,22	12,3			
Ureia	2	11,0	0,02	0,14	9,6			
Creatinina	1	0,27	0,01	0,10	9,3			
Glicose	5	19,1	0,04	0,20	7,4			
	Regressão base	eada na PLS	(PLSR)					
Componente	No. de variáveis	RMSEcv	R <sup>2</sup> cv	r	Erro (%)			
Colesterol total	8	10,50	0,93	0,96	3,5			
Triglicerídeos	9	21,4	0,93	0,96	3,8			
HDL	9	13,0	0,42	0,65	9,7			
Ureia	9	4,9	0,80	0,89	4,3			
Creatinina	6	0,21	0,41	0,64	7,3			
Glicose	11	15,4	0,38	0,62	6,0			

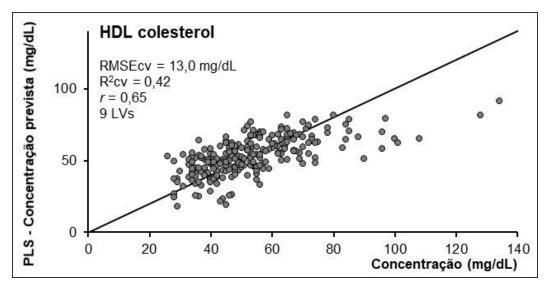
As Figuras 11 a 16 mostram as concentrações preditas *versus* reais (espectrofotométricas) para o modelo de regressão PLS; este modelo foi o que obteve os melhores resultados.



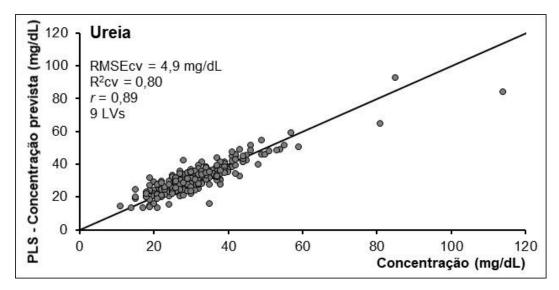
**Figura 11.** Concentrações previstas de colesterol total em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.



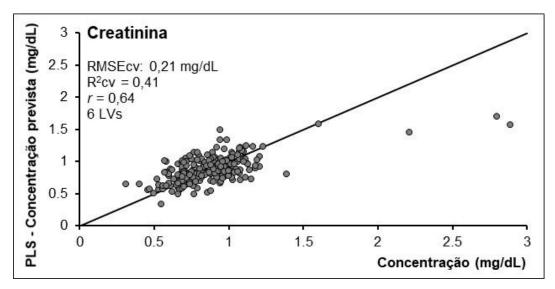
**Figura 12.** Concentrações previstas de triglicerídeos em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.



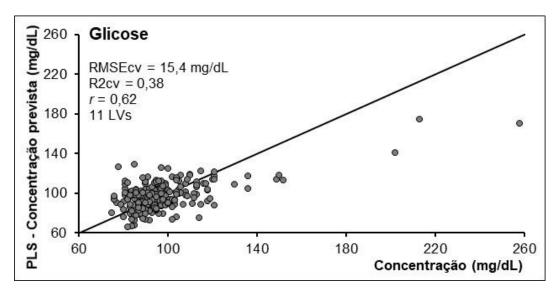
**Figura 13.** Concentrações previstas de HDL colesterol em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.



**Figura 14.** Concentrações previstas de ureia em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.



**Figura 15.** Concentrações previstas de creatinina em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.



**Figura 16.** Concentrações previstas de glicose em relação às concentrações de referência utilizando a regressão por PLS com validação cruzada *leave-one-out*.

### 4.4 Modelo de classificação baseado na discriminação via PCR e PLSR

Tendo sido realizada a quantificação das concentrações dos analitos utilizando os modelos de regressão PCR e PLSR, os valores das concentrações previstas obtidos tanto pelo modelo PLS quanto pelo PCA (via Chemoface) foram também utilizados

para classificar as amostras nos grupos normal (referência) e alterado, com o intuito de fornecer uma informação de triagem baseada nas concentrações estimadas pelos modelos (Tabelas 7 e 8). Este modelo foi utilizado e demonstrado nos resultados já que apresentou melhor desempenho em relação ao PLS-DA (PLS discriminante) e PCA-DA (PCA discriminante/PCA-DA), para os quais os dados dos espectros também foram submetidos.

Ademais, a discriminação visando a classificação dos espectros das amostras entre resultados normais (referência) e alterados foi também realizada por meio de discriminação PCA (PCR-DA) e discriminação PLS (PLS-DA), sendo esta discriminação baseada na utilização das variáveis de concentração pelo método padrão e as variáveis espectrais para estimar a concentração.

A Tabela 7 apresenta o número de espectros classificados corretamente utilizando o valor da concentração prevista pela PCA e por meio da PCR-DA, enquanto que a Tabela 8 apresenta o número de espectros classificados corretamente utilizando o valor da concentração prevista pelo PLS e por meio da PLS-DA, sendo que o resultado com melhor desempenho de classificação foi atribuído ao modelo que utilizou o valor da concentração prevista pelo PLS para a classificação dos espectros nos grupos normal e alterado.

**Tabela 7.** Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação por PCR-DA e utilizando valor da concentração prevista por PCA.

Componente bioquímico (número de espectros)	No. de espectros classificados como normal/No. de amostras no grupo normal	No. de espectros classificados como alterado/No. de amostras no grupo alterado	Classificação correta
	(	Classificação PCR-DA	
Colesterol Total (241)	111/136	75/105	77,2%
Triglicerídeos (241)	154/165	47/76	83,4%
HDL Colesterol (240)	184/185	0/55	72,9%
Ureia (240)	231/231	0/9	96,2%
Creatinina (242)	237/237	0/5	97,9%
Glicose (239)	173/174	2/65	73,2%
Precisão Geral		83,5%	
	Classificação PCA	utilizando valor da concentra	ção prevista
Colesterol Total (241)	111/136	79/105	77,6%
Triglicerídeos (241)	144/165	54/76	82,2%
HDL Colesterol (240)	185/185	0/55	72,5%
Ureia (240)	231/231	00/09	96,2%
Creatinina (242)	237/237	00/05	98,0%
Glicose (239)	133/174	23/65	65,3%
Precisão Geral		82,2%	

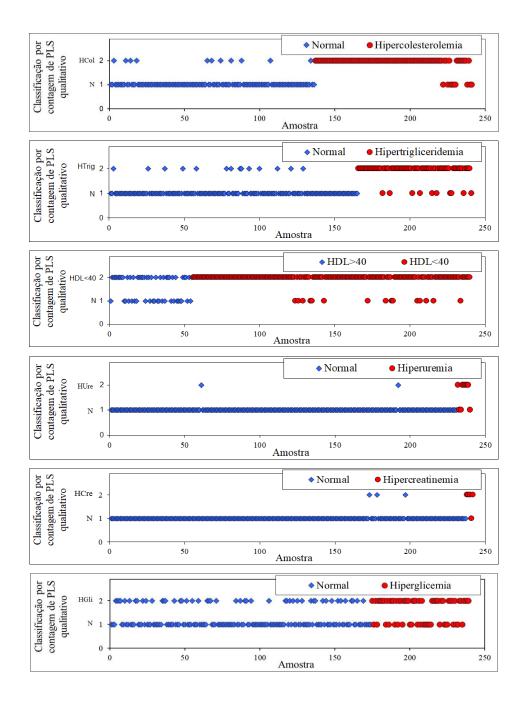
**Tabela 8.** Resultados da classificação em grupos normal e alterado pela discriminação por PLS-DA e utilizando valor da concentração prevista por PLS.

Componente bioquímico (número de espectros)	No. de espectros classificados com normal/No. de amostras no grupo normal	classificados com classificados como ormal/No. de amostras alterado/No. de amostras no	
		Classificação PLS-DA	
Colesterol Total (241)	126/136	85/105	87,5%
Triglicerídeos (241)	154/165	58/76	88,0%
HDL Colesterol (240)	174/185	14/55	78,3%
Ureia (240)	231/231	2/9	97,1%
Creatinina (242)	237/237	0/5	98,0%
Glicose (239)	173/174	3/65	73,6%
Precisão Geral		87,1%	
	Classificação PLS	utilizando valor da concentra	ıção prevista
Colesterol Total (241)	125/136	96/105	91,7
Triglicerídeos (241)	151/165	66/76	90,0
HDL Colesterol (240)	170/185	23/55	80,4
Ureia (240)	229/231	6/9	97,9
Creatinina (242)	234/237	4/5	98,3
Glicose (239)	125/174	40/65	69,0
Precisão Geral		87,9%	

A Figura 17 apresenta a plotagem binária da discriminação baseada nos valores das concentrações previstas por PLS a partir dos valores de referência obtidos por análise espectrofotométrica, conforme mostrado na Tabela 8 (classificação PLS utilizando valor da concentração prevista), (classificação PLS utilizando valor da concentração prevista). Os pontos em azul representam os espectros classificados como

normais (classe No. 1) e os em vermelho representam os espectros classificados como alterado (classe No. 2).

Analisando-se comparativamente a classificação fundamentada na espectrofotometria e os agrupamentos baseados nas concentrações estimadas pela espectroscopia Raman, foram calculados parâmetros analíticos para a avaliação da espectroscopia Raman para diagnóstico, conforme apresentados nas Tabelas 9 e 10 (SIM; WRIGHT, 2005).



**Figura 17.** Plotagem binária dos agrupamentos resultantes da discriminação baseada nos valores das concentrações previstas por PLS mostrado na Tabela 8 (classificação PLS utilizando valor da concentração prevista).

Ao analisar comparativamente a classificação dos dados em grupos normais e alterados com base nas concentrações estimadas por espectroscopia Raman e espectrofotometria (dados da Tabela 8), foram calculados os parâmetros analíticos (SIM; WRIGHT, 2005) para avaliar a espectroscopia Raman como técnica de rastreamento; os resultados são apresentados na Tabela 9.

Assim, foram descritos os parâmetros analíticos comparando os resultados das concentrações estimadas pela espectroscopia Raman no modelo PCR-DA com a metodologia padrão, e por discriminação das amostras com concentrações bioquímicas normais e alteradas que tiveram valores de concentração prevista pelo modelo PCA dentro das respectivas faixas de referência ou alteradas (Tabela 9). Os mesmos parâmetros foram descritos para a PLS-DA e discriminação pelas concentrações obtidas pela PLS (Tabela 10).

Nas Tabelas 9 e 10 constam os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, classificação correta e incorreta e o coeficiente de Kappa, considerando os resultados da discriminação dos espectros Raman comparativamente aos resultados bioquímicos pelo método de referência (ENUE; GEORGIADIS; JOHNSON, 2000; SIM; WRIGHT, 2005).

**Tabela 9.** Parâmetros analíticos comparando os resultados da espectroscopia Raman com a metodologia padrão, com a classificação baseada em PCR-DA, e baseada nas concentrações obtidas por PCA quantitativo.

Classificação PCR-DA		С	omposto	bioquími	co	
Parâmetro analítico	COL	TRIG	HDL	URE	CREA	GLIC
Sensibilidade	0,71	0,62	0,00	0,00	0,00	0,03
Especificidade	0,82	0,93	0,99	1,00	1,00	0,99
Valor preditivo positivo	0,75	0,81	0,0	0,00	0,00	0,67
Valor preditivo negativo	0,79	0,84	0,77	0,96	0,97	0,73
Prevalência real	0,44	0,32	0,23	0,37	0,21	0,27
Prevalência estimada	0,41	0,24	0,0	0,00	0,00	0,01
Classificação correta (precisão) (%)	77,17	83,40	76,7	96,25	97,93	73,22
Classificação incorreta (%)	22,83	16,60	23,3	3,75	2,07	26,78
Coeficiente de Kappa	0,53	0,59	0,0	0,00	0,00	0,04
Classificação PCA utilizando valor		С	omposto	bioquími	20	
da concentração prevista						
Parâmetro analítico	COL	TRIG	HDL	URE	CREA	GLIC
Sensibilidade	0,75	0,71	0,0	0,0	0,0	0,35
Especificidade	0,82	0,87	1,0	1,0	1,0	0,76
Valor preditivo positivo	0,76	0,72	0,0	0,0	0,0	0,36
Valor preditivo negativo	0,81	0,87	0,77	0,96	0,98	0,76
Prevalência real	0,44	0,32	0,23	0,04	0,21	0,27
Prevalência estimada	0,43	0,31	0,0	0,0	0,0	0,27
Classificação correta (precisão) (%)	78,84	82,15	77,1	96,25	97,93	65,27
Classificação incorreta (%)	21,16	17,85	22,9	3,75	2,07	34,73
Coeficiente de Kappa*	0,57	0,59	0,0	0,0	0,0	0,12
*Interpretação do coeficiente de Kapp	; WRIGHT, 2005):					
Menor que 0 – Insignificante	Entre 0,41 e 0,6 – Moderada					
Entre 0 e 0,2 – Fraca	Entre 0,61 e 0,8 – Forte					
Entre 0,21 e 0,4 – Razoável	Entre 0,81 e 1 –Quase perfeita					

Colesterol total (COL); triglicerídeos (TRIG); HDL colesterol (HDL); ureia (URE); creatinina (CREA); glicose (GLIC)

**Tabela 10.** Parâmetros analíticos comparando os resultados da espectroscopia Raman com a espectrofotometria, baseados em PLS-DA e por discriminação pelas concentrações obtidas por PLS quantitativo.

Classificação PLS-DA		Composto bioquímico				
Parâmetro analítico	COL	TRIG	HDL	URE	CREA	GLIC
Sensibilidade	0,81	0,76	0,25	0,22	0,00	0,05
Especificidade	0,93	0,93	0,94	1,00	1,0	0,99
Valor preditivo positivo	0,89	0,84	0,56	1,00	0,00	0,75
Valor preditivo negativo	0,86	0,90	0,81	0,97	0,97	0,74
Prevalência real	0,44	0,32	0,23	0,04	0,02	0,27
Prevalência estimada	0,39	0,29	0,10	0,01	0,00	0,02
Classificação correta (precisão) (%)	87,55	87,97	78	97,08	97,93	73,64
Classificação incorreta (%)	12,45	12,03	22	2,92	2,07	23,26
Coeficiente de Kappa	0,74	0,71	0,24	0,35	0,00	0,06
Classificação PLS utilizando valor		C	omposto	bioquímio	co	
da concentração prevista						
Parâmetro analítico	COL	TRIG	HDL	URE	CREA	GLIC
Sensibilidade	0,91	0,87	0,42	0,67	0,80	0,62
Especificidade	0,92	0,92	0,92	0,99	0,98	0,72
Valor preditivo positivo	0,90	0,83	0,61	0,75	0,57	0,45
Valor preditivo negativo	0,93	0,94	0,84	0,99	0,99	0,83
Prevalência Real	0,44	0,32	0,23	0,04	0,021	0,27
Prevalência Estimada	0,44	0,33	0,16	0,03	0,029	0,37
Classificação correta (precisão) (%)	91,70	90,0	80,4	97,9	98,3	69,0
Classificação incorreta (%)	8,3	10,0	20,0	2,0	1,7	31,0
Coeficiente de Kappa*	0,83	0,77	0,38	0,70	0,66	0,30
*Interpretação do coeficiente de Kapp	pa (SIM;	WRIGHT,	2005):			
Menor que 0 – Insignificante		Entre 0,41 e 0,6 – Moderada				
Entre 0 e 0,2 – Fraca		Entre 0,61 e 0,8 – Forte				
Entre 0,21 e 0,4 – Razoável	Entre 0,81 e 1 – Quase perfeita					

Colesterol total (COL); triglicerídeos (TRIG); HDL colesterol (HDL); ureia (URE); creatinina (CREA); glicose (GLIC)

### 5 DISCUSSÃO

Amostras de soro humano foram analisadas por espectroscopia Raman. As concentrações de elementos bioquímicos no soro (colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose) foram previstas usando o modelo de regressão PLS aplicado a espectros Raman e então comparadas às concentrações determinadas valendo-se da metodologia espectrofotométrica padrão visando determinar o desempenho analítico da espectroscopia Raman.

Vários autores exploraram a possibilidade de usar a espectroscopia Raman em análises clínicas, conforme pode ser verificado na Tabela 11.

Berger; Itzkan; Feld (1997) desenvolveram um modelo "calibrado" para determinar a concentração de glicose em amostras de sangue total humano de um único voluntário utilizando a PLS e obtiveram um erro de 3,6 mM e coeficiente de correlação linear de 0,99.

Dingari et al (2012) propuseram quantificar e discriminar a albumina glicada no soro humano liofilizado. Utilizando como ferramenta estatística a PLS para quantificação, foi obtido um erro de 16%, precisão de 21,6% e coeficiente de correlação linear de 0,9986; e uma precisão de 100% para diferenciação entre albumina glicada e não glicada utilizando para isto a PCR.

Borges et al. (2015) avaliaram amostras de soro *in vitro* visando a classificação das amostras entre normais e alteradas através da PCA, sendo determinada uma porcentagem correta de classificação de 70% para glicose, 77% para colesterol total, 81% para triglicerídeos, 59% para HDL colesterol e 60% para LDL colesterol.

Almeida et al. (2016) desenvolveram um modelo espectral baseado em PLS para estimar as concentrações de ureia e creatinina no sangue humano utilizando 102 amostras, sendo 55 de pacientes sem alteração para doença renal e 47 amostras de pacientes com doença renal, em que foi obtido um coeficiente de correlação linear de 0,97 e 0,93 e erro de 17,6 mg/dL e 1,94 mg/dL para ureia e creatinina, respectivamente. O mesmo artigo analisou a discriminação entre diálise e normalidade por meio do PCR, obtendo precisão de 95%, sensibilidade de 91% e especificidade de 98%.

Silveira et al. (2017) valeram-se de um conjunto de 44 amostras de soro avaliadas tanto por colorimétrico quanto por Raman/PLS, demonstrando a viabilidade

do uso dos recursos espectrais Raman para estimar a concentração de triglicerídeos, colesterol total e frações HDL e LDL, além de glicose, com erros de previsão de 35,4 mg/dL para triglicerídeos, 15,9 mg/dL para colesterol total, 17,8 mg/dL para HDL colesterol, 24,2 mg/dL para colesterol LDL e 26,4 mg/dL para glicose, em comparação com erros de previsão inferiores de 21,4 mg/dL para triglicerídeos, 10,5 mg/dL para colesterol total, 13,0 mg/dL para HDL colesterol e 15,4 mg/dL para glicose alcançados no presente estudo.

**Tabela 11.** Lista de estudos que exploraram a possibilidade de uso da espectroscopia Raman em análises clínicas para determinação de elementos bioquímicos em soro e sangue total.

Citação	Elemento bioquímico analisado	Material analisado	Modelo estatístico	Resultados	
Berger, Itzkan; Feld, 1997	Glicose	Sangue total	PLS	Erro: 3,6 mM, r: 0,99	
Dingari et al., 2012	Albumina Glicada	Soro humano liofilizado	PLS PCA	Erro: 16%, <i>r</i> : 0,9986  Precisão: 21,6%  Albumina glicada: 100%	
Borges et al, 2015	Glicose, Colesterol total, Triglicerídeos, HDL e LDL	Soro humano	PCA	Glicose: 70%; Colesterol total: 77%; Triglicerídeos: 81%; HDL: 59%; LDL: 60%	
Almeida et al., 2016	Ureia e creatinina	Soro humano	PLS	Ureia Erro: 17,6 mg/dL; r: 0,97 Creatinina Erro: 1,94 mg/dL; r: 0,93	
			PCA	Discriminação entre diálise e normalidade Precisão: 95% Sensibilidade: 91% Especificidade: 98%	
Silveira et al., 2017	Triglicerídeos, Colesterol total, HDL,	humano	ol humano oL,	PLS	Triglicerídeos RMSEcv: 35,4 mg/dL; Erro: 4,0%; R <sup>2</sup> : 0,96; <i>r</i> : 0,98
	LDL, Glicose			Colesterol RMSEcv: 15,9 mg/dL; Erro: 2,0%; R <sup>2</sup> : 0,93; <i>r</i> : 0,96	
				HDL RMSEcv: 17,8 mg/dL; Erro: 3,2%; R <sup>2</sup> : 0,56; <i>r</i> : 0,75	
				LDL RMSEcv: 24,2 mg/dL; Erro: 20%; R <sup>2</sup> : 0,74; r: 0,86	
				Glicose RMSEcv: 26,4 mg/dL; Erro: 3,5%; R <sup>2</sup> : 0,74; <i>r</i> : 0,86	

### 5.1 Espectros das diferenças entre amostras com resultados normais e alterados

O espectro Raman médio das 242 amostras analisadas (Figura 4) exibiu picos característicos dos constituintes do soro, principalmente albumina e os elementos bioquímicos em estudo (KRAFTT et al., 2005; MOREIRA et al., 2008; BISPO et al., 2013; TALARI et al., 2014; BORGES et al., 2015). Apesar da presença de picos intensos de albumina devido à sua alta concentração em relação aos outros constituintes do sangue (PARKER, 1983, MESCHER, 2013), regiões espectrais e/ou bandas relacionadas aos compostos avaliados no estudo apresentaram diferença relevante entre as amostras com valores normais e alterados (teste t, p <0,01), como demonstrado por Silveira et al. (2017), o que permitiu o desenvolvimento de modelos de regressão para estimar as concentrações do analito, bem como a discriminação entre sujeitos com valores normais e alterados. Além disso, como a albumina é um constituinte sérico comum e os espectros de diferença não mostram a presença de picos de albumina (Figuras 5 a 10), as amostras com concentrações alteradas não evidenciaram hipo ou hiper albuminemia nos grupos.

### 5.2 Modelos quantitativos baseados em regressão PCR e PLS

Modelos matemáticos baseados em regressão multivariada PCR e PLSR foram empregados para estimar as concentrações de cada constituinte do soro. A análise da Tabela 6 permitiu verificar que o modelo PLSR obteve melhor desempenho em relação ao PCR, sendo então os resultados do modelo PLSR plotados conforme Figuras 11 a 16.

Usando o modelo de regressão PLSR para prever a concentração dos analitos selecionados, o coeficiente de correlação r foi de 0,96 para colesterol total e triglicerídeos, 0,65 para HDL colesterol, 0,89 para ureia, 0,64 para creatinina e 0,62 para glicose (Tabela 6). O erro médio de concentração foi estimado utilizando o valor de concentração máxima para o composto bioquímico a ser estimado por espectrofotometria (método padrão) e foi verificado que todos os compostos apresentaram erro de concentração estimado menor que 10%. Este foi mais expressivo para colesterol total e triglicérides, com erros estimados menores que 4% (Tabela 6). O efeito dos picos Raman da albumina no modelo não foi avaliado; como a normalização

pela área sob a curva (norma 1) foi aplicada, qualquer flutuação na intensidade das bandas Raman atribuídas à albumina pode ser considerada subvalorizada.

Pode-se verificar que o coeficiente de correlação para HDL colesterol (0,65), creatinina (0,64) e glicose (0,62) foi menos satisfatório que os demais bioquímicos deste estudo (Figuras 13, 15, 16, respectivamente). A diferença entre a concentração espectrofotométrica e a concentração prevista principalmente em amostras com maiores concentrações desses três compostos pode apresentar um viés disposto pelo modelo devido ao uso de amostras de ambulatório, que geralmente apresentam concentrações mais próximas do normal, limitando assim a modelagem de amostras com alta concentração. Mesmo com essa questão limitante, esses resultados do colesterol total e triglicerídeos, compostos séricos relacionados à síndrome metabólica, poderiam rastrear a população quanto à presença desses bioquímicos em altas concentrações.

### 5.3 Modelo de classificação entre normais e alterados baseado em discriminação via PCA (PCR) e PLS

Os resultados da classificação em grupos normais e alterados pelo PLS-DA e as concentrações estimadas pelo modelo PLSR apresentaram alta precisão em relação à análise discriminante por PCA (PCR), pois no PLS a redução da dimensão dos dados ocorre junto com a identificação da variabilidade entre os grupos, enquanto na PCA os coeficientes indicam a variabilidade total presente no conjunto amostral (BARKER, 2003). Portanto, as concentrações previstas pelo PLSR podem classificar melhor os espectros em indivíduos com soros normais ou alterados, rastreando assim as amostras com concentrações alteradas em comparação com as amostras com valores de referência.

A análise discriminante também foi realizada tanto pelo PLS-DA (via Chemoface) quanto pela concentração fornecida pelo modelo PLSR, sendo o resultado da discriminação pela concentração fornecida pelo PLSR a de melhor desempenho. Os resultados da classificação pela concentração prevista pelo PLSR revelaram grupos normais e alterados, portanto, foi possível classificar entre indivíduos normais e alterados, podendo inicialmente ser utilizado para triagem de amostras com concentrações alteradas em relação a amostras com valores de referência.

As concentrações previstas pelo PLS classificaram os espectros dos indivíduos em grupos normal e alterado. O modelo discriminante apresentou alta precisão para colesterol total, triglicerídeos e HDL colesterol: 91,7%, 90,0% e 80,4%, respectivamente. No entanto, a glicose teve precisão insatisfatória de apenas 69,0%. Para ureia e creatinina, mesmo com altos percentuais de classificação, 97,9% e 98,3%, respectivamente, o número muito baixo de amostras com valores alterados foi um fator limitante e esse resultado não pode ser totalmente considerado (Tabela 8).

# Parâmetros analíticos comparando os resultados da espectroscopia Raman com a metodologia padrão, baseados em PCR-DA e PLS-DA, e classificação por discriminação usando as concentrações obtidas por PCA (PCR) e PLSR quantitativo

Para que um novo instrumento seja utilizado, mesmo em sua fase de desenvolvimento, é necessário que sua confiabilidade seja estimada. O coeficiente de Kappa pode ser empregado com esta finalidade, já que avalia o grau de concordância entre os métodos analisados (SIM; WRIGHT, 2005), conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10. Com isto, verifica-se que na comparação entre as análises da classificação utilizando as concentrações previstas, o modelo PLSR foi o que ofereceu melhores resultados comparativamente ao método padrão, no qual, através do coeficiente de Kappa, observou-se que foi quase perfeita para colesterol total, forte para triglicerídeos, creatinina e ureia, fraca para o HDL colesterol e glicose.

Os parâmetros analíticos descritos na Tabela 10 mostraram que, para o colesterol total, há alta correlação entre o padrão e a metodologia testada (r = 0.96). O RMSEcv de 10,5 mg/dL representou 3,5% de erro para este composto em relação ao valor máximo do método de referência (Tabela 6). A alta sensibilidade e valor preditivo positivo (VPP) de 0,91 e 0,90, respectivamente, alta especificidade e valor preditivo negativo (VPN) de 0,92 e 0,93, respectivamente, indicaram bom desempenho para determinação de resultados normais ou alterados. Além disso, as prevalências reais e estimadas foram muito semelhantes (0,44), indicando que o teste é capaz de classificar corretamente o espectro no grupo normal ou alterado, com precisão de 91,7%. O

coeficiente Kappa de 0,83 demonstrou uma concordância muito boa entre os dois métodos analíticos (SIM; WRIGHT, 2005).

Os triglicerídeos exibiram alta correlação entre o padrão e a metodologia testada (r=0.96). O RMSEcv de 21,4 mg/dL representou 3,8% de erro para este composto em relação ao valor máximo do método de referência. A alta sensibilidade, VPP, especificidade e VPN (0,87, 0,83, 0,92 e 0,94, respectivamente), indicaram bom desempenho para determinação de resultados normais ou alterados. As prevalências real e estimada apresentaram valores de 0,32 e 0,33, respectivamente, mostrando que houve uma boa classificação em normal ou alterado, com uma precisão de 90,0%. O coeficiente Kappa de 0,77 demonstrou boa concordância entre os dois métodos.

O HDL colesterol apresentou correlação intermediária entre o padrão e a metodologia testada (r = 0,65) e um RMSEcv de 13,0 mg/dL, o que representa um erro de 9,7% em relação ao valor máximo do método de referência. A sensibilidade e o VPP de 0,42 e 0,61, nessa ordem, indicaram capacidade limitada para determinar indivíduos com resultados alterados. Entretanto, os valores de especificidade e VPN de 0,92 e 0,84, respectivamente, mostram que a determinação de soros com resultados normais apresenta melhor desempenho, com poucos falsos positivos, com prevalência real e estimada de 0,23 e 0,16, respectivamente. O coeficiente Kappa de 0,38 demonstrou concordância razoável entre os dois métodos analíticos.

Ureia e creatinina apresentaram menos sujeitos com valores elevados (característica de amostras ambulatoriais), o que limita a interpretação dos parâmetros analíticos. No entanto, a correlação, que é um parâmetro da curva de concentração, foi definida. Para a ureia, houve alta correlação entre o valor do PLS em relação ao valor da técnica padrão (r = 0.89), com RMSEcv de 4,9 mg/dL e erro de 4,3% em relação ao valor máximo do método padrão. Com a creatinina, a correlação r entre o padrão e a metodologia testada (r = 0.64) foi intermediária. A validação cruzada do erro quadrático médio foi de 0,21 mg/dL, o que representa 7,3% do erro médio em relação ao valor máximo do método de referência para este elemento.

A glicose apresentou correlação intermediária entre o padrão e a metodologia testada (r=0.62) e um RMSEcv de 15,4 mg/dL, o que representa 6,0% de erro em relação ao valor máximo do método de referência. Os resultados mostraram uma capacidade limitada de determinar resultados elevados para amostras alteradas, uma vez

que a sensibilidade e o VPP foram de 0,62 e 0,45, respectivamente. Além disso, a especificidade e o VPN de 0,72 e 0,83, respectivamente, e a prevalência real e estimada de 0,27 e 0,37, respectivamente, indicam que os resultados normais também não foram claramente evidenciados, com muitos falsos positivos e falsos negativos. Isso foi confirmado com o coeficiente Kappa, 0,30, que indica apenas uma concordância razoável entre as metodologias. Esses resultados sugerem que essa metodologia não é adequada para a triagem de glicose.

## 5.5 Limitações e aperfeiçoamento da espectroscopia Raman

As aplicações da espectroscopia Raman em análises de sangue e soro têm algumas limitações, incluindo a emissão de fluorescência de fundo de componentes do sangue (MOREIRA et al., 2008), a baixa sensibilidade para detecção de compostos em baixa concentração em amostras biológicas, uma vez que alguns compostos bioquímicos apresentam picos Raman que são sobrepostos por picos de compostos com maior concentração (MOREIRA et al., 2008), e a dependência do comprimento de onda no espalhamento Raman, em que a quantidade de fótons espalhados diminui com a excitação no infravermelho próximo (BUCKLEY; RYDER, 2017).

Apesar desses fatores, que estão em constante desenvolvimento para estratégias de aumento da relação sinal-ruído, a espectroscopia Raman pode se apresentar como uma técnica com características particulares e relevantes para a medicina laboratorial, como a manutenção da integridade da amostra após análise, utilizando um pequeno volume de amostra, não empregando reagentes ou aditivos (*label free*), usando um único espectro para a obtenção de informações múltiplas, minimizando custos e erros nas fases laboratoriais pré-analíticas e analíticas (TALARI et al., 2014).

A espectroscopia Raman representa um grande avanço para a bioquímica clínica, e apesar das diversas vantagens já destacadas, também apresenta alguns elementos passíveis de melhoria, para os quais grupos de pesquisa têm se empenhado em encontrar soluções. Dentre estas limitações observa-se a interferência da fluorescência (BUCKLEY; RYDER, 2017), baixa sensibilidade da técnica em decorrência da complexidade química das amostras do sistema biológico, e baixa concentração de alguns elementos químicos ou biomoléculas, cujos sinais são

sobrepostos por elementos de maior concentração (STONE, 2015; BUCKLEY; RYDER, 2017; KONG; KENDALL; NUNES, 2018), além de que apenas uma parte bastante diminuída do espalhamento resulta em um fóton espalhado por Raman, o que torna o sinal fraco, principalmente com excitação na região do infravermelho próximo (BUCKLEY; EMBER et al., 2017; RYDER, 2017; NUNES, 2018).

A fluorescência pode ocorrer pela excitação dos fótons a moléculas em estados eletrônicos mais altos, decaindo ao estado fundamental com a emissão de um fóton de baixa energia, que apesar de ocorrer na mesma faixa de comprimento de onda que o espectro Raman, apresenta um rendimento quântico muito maior, obscurecendo o fraco sinal Raman (BERGER; ITZKAN; FELD, 1997). Para minimizar este efeito, foi descrito que a maneira mais fácil de removê-la é por meio da utilização de fontes de excitação em comprimentos de onda mais longos, tais como 785, 830 e 1064 nm, limitando assim a absorção eletrônica inicial, porém deve-se levar em conta que este procedimento reduz ainda mais o sinal Raman, já que a eficiência do espalhamento da luz por moléculas é proporcional à quarta potência da frequência de excitação (BUCKLEY; RYDER, 2017).

As tecnologias de espalhamento Raman com superfície melhorada (SERS), espalhamento Raman por ressonância de superfície melhorada (SERRS) e espectroscopia Raman de ressonância no ultravioleta (UVRRS) são estratégias para tentar melhorar a limitação da sensibilidade tanto pela complexidade química como pela concentração dos elementos bioquímicos, contudo elas não têm baixo custo, tampouco robustez, e por isso não conseguem ser empregadas efetivamente quando comparadas à espectroscopia Raman dispersiva (BUCKLEY; RYDER, 2017; EMBER et al., 2017).

Os métodos estatísticos, tais como PCA e PLS também são estratégias para melhorar a sensibilidade, possibilitando a interpretação dos espectros sem equívoco, através da redução da dimensionalidade, reduzindo o conjunto de dados, identificando as fontes de variação entre os espectros e eliminando a informação irrelevante ou aleatória (ruído de fóton por exemplo) (EMBER et al., 2017; NUNES, 2018).

Com relação ao fraco sinal Raman, já que apenas parte do espalhamento ocasionado na amostra resulta na origem de um fóton Raman, tem-se utilizado a SERS, espectroscopia Raman com ponta otimizada (TERS) ou nano-Raman, já que esta

estratégia melhora o sinal Raman de maneira que a detecção de apenas uma molécula seja possível (BUCKLEY; RYDER, 2017; EMBER et al., 2017; NUNES, 2018). Além disso, a fixação ou conservação de amostras biológicas por processos químicos podem alterar o espectro Raman, já que o mesmo analisa a composição química do meio, sendo assim, o método de conservação adequado para espectroscopia Raman é o congelamento, e mesmo assim, seu processo de descongelamento deve ser feito com cautela, evitando formação de suspensões de nano cristais em decorrência do descongelamento incompleto (EMBER et al., 2017).

## 6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou que amostras de soro *in vitro* de sujeitos humanos normais e alterados mostraram bandas Raman e/ou regiões espectrais com diferenças significativas para os bioquímicos selecionados apresentados no soro: colesterol total, triglicerídeo, HDL colesterol, ureia, creatinina e glicose (teste t de Student, p < 0.01). Essas bandas e/ou regiões espectrais coincidiram com as bandas em que os picos Raman mais intensos dos bioquímicos são encontrados.

Modelos de regressão baseados em PLS (PLSR) previram a concentração de colesterol total, triglicerídeos, HDL, ureia, creatinina e glicose, com correlações r = 0.96, 0.96, 0.65, 0.89, 0.64 e 0.62, e RMSEcv = 10.5, 21.4, 13.0, 4.9, 0.21 e 15.4 mg/dL, respectivamente, mostrando bons resultados obtidos, com um percentual de erro de estimativa da concentração em relação ao valor máximo de cada elemento referenciado ao resultado do modelo PLSR *versus* concentração bioquímica pelo método padrão de 3.5% (10.5 mg/dL), 3.8% (21.4 mg/dL), 9.7% (13.0 mg/dL), 4.3% (4.9 mg/dL), 7.3% (0.21 mg/dL) e 6.0% (15.4 mg/dL), respectivamente. O número de amostras com concentrações alteradas utilizadas para a análise dos elementos ureia e creatinina representou menos de 5% do total de amostras, o que limitou a interpretação desses resultados já que são amostras ambulatoriais.

Para a determinação dos parâmetros analíticos, assim como ocorreu para a classificação, a comparação da espectroscopia Raman baseada na contagem dos resultados obtidos por PLSR quantitativo com a metodologia padrão também obteve os melhores resultados, mostrando que este é o modelo mais eficiente para o objetivo da pesquisa. Para colesterol total e triglicérides, verificou-se bom desempenho, com sensibilidade de 0,91 e 0,87, especificidade de 0,92 para ambos, valor preditivo positivo de 0,90 e 0,83 e valor preditivo negativo de 0,93 e 0,94, respectivamente.

Com a classificação qualitativa, segundo o coeficiente Kappa, observou-se concordância muito boa para o colesterol total, boa para triglicerídeos e ruim para HDL colesterol e glicose, demonstrando o potencial da espectroscopia Raman para ser utilizada na triagem da população em geral. Para ureia e creatinina, embora o coeficiente tenha sido considerado bom para creatinina e ureia, o mesmo não foi discutido devido ao número reduzido de amostras alteradas no grupo de estudo.

A técnica Raman mostrou-se uma ferramenta promissora para análises quantitativas de colesterol total e triglicerídeos em amostras de soro, de maneira rápida e sem o preparo da amostra, com possibilidade de aplicação da metodologia em laboratórios de análises clínicas e adequados para triagem rápida.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, David Michael. The Relationship Between Variable Selection and Data Augmentation and a Method for Prediction. **Technometrics**, v 16, n 1, p 125-127, 2012.

ALMEIDA, Maurício Liberal; SAATKAMP, Cassiano Junior; FERNANDES, Adriana Barrinha; PINHEIRO, Antônio Luiz Barbosa; SILVEIRA, Landulfo. Estimating the concentration of urea and creatinine in the human serum of normal and dialysis patients through Raman spectroscopy. **Laser in Medical Science**, v. 31, n 7, p. 1415-1423, 2016.

ANZANELLOB, Michel José. Seleção de variáveis para classificação de bateladas produtivas com base em múltiplos critérios. **Production**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2013.

An international historic chemical landmarks. The Raman effects. **American Chemical Society**, 1998. Disponível em: http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/ramaneffect.html. Acesso: 14 de abril de 2021.

BANCHS, Javier E.; SCHER, David Lee. Emerging role of digital technology and remote monitoring in the care of cardiac patients. **Medical Clinical of North America**, v. 99, n. 4, p. 877-896, 2015.

BARKER, Matthew; RAYENS, William. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003.

BARMAN, Ishan; DINGARI, Narahara Chari; KANG, Jeon Woong; HOROWITZ, Gary L.; DASARI, Ramachandra Rao; FELD, Michael S. Raman spectroscopy-based sensitive and specific detection of glycated hemoglobin. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p 2474 – 2482, 2012.

BERGER, Andrew; ITZKAN, Irving; FELD, Michael S. Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v. 53A, n. 2, p. 287-292, 1997.

BERLITZ, Fernando de Almeida. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** v. 46, n. 5, p. 353-363, 2010.

BEZERRA, Aline C.; SAMPAIO, Helena A. C.; MELO, Maria Luiza P.; MAIA, Carla Soraya C.; ALMEIDA, Paulo César. Associação entre dislipidemia e excesso de peso de crianças e adolescentes atendidos em uma Unidade de Saúde. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 348-362, 2011.

BISPO, Jeyse Aliana Martins; VIEIRA, Elzo Everton de Sousa; SILVEIRA, Landulfo; FERNANDES, Adriana Barrinha. Correlating the amount of urea, creatinine and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 8, p. 87004, 2013.

BOONE, Joe. How can we make laboratory testing safer? **Clinical Chemistry and Laboratory** Medicine, v. 45, n. 6, p. 708-711, 2007.

BORGES, Rita de Cassia Fernandes; NAVARRO, Ricardo Scarparo; GIANA, Hector Enrique; TAVARES, Fernanda Brubisich; FERNANDES, Adriana Barrinha; SILVEIRA, Landulfo. Detecting alterations of glucose and lipid components in human serum by near-infrared Raman spectroscopy. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 160-168, 2015.

BORISSEVITCH, Iouri E.; GONÇALVES, Pablo José; SCHABERLE, Fábio Antônio. Lei de Lambert-Beer, *In*: **Fundamentos da espectroscopia de absorção óptica.** São Paulo, Livraria da Física, 2016; p. 18-21.

BRERETON, Richard G.; JANSEN, Jeroen; LOPES, João; MARINI, Frederico; POMERANTSEV, Alexey; RODIONOVA, Oxana; ROGER, Jean Michel; WALCZAK, Beata; TAULER, Romà. Chemometrics in analytical chemistry – part II: modeling, validation, and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 6691-6704, 2018.

BUCKLEY, Kevin; RYDER, Alan G. Applications of Raman spectroscopy in biopharmaceutical manufacturing: A Short Review. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 6, p. 1085-1116; 2017.

CAMPANA, Gustavo Aguiar; OPLUSTIL, Carmen Paz; FARO, Lorena Brito. Tendências em medicina laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 47, n. 4, p. 399-408, 2011. https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000400003.

CARRARO, Paolo; PLEBANI, Mario. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1338-1342.

CHAVES, Carla D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 352, 2010.

CHAVES, Gabriela S. S.; GHISI, Gabriela L. M.; GRACE, Sherry L.; OH, Paul; RIBEIRO, Antônio L.; BRITO, Raquel R. Effects of comprehensive cardiac rehabilitation on functional capacity and cardiovascular risk factors in Brazilians assisted by public health care: protocol for a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 20, p. 20, n. 6, p. 592-600, 2016.

CHUNXIU, Hu; HEIJDEN, Van der Rob; WANG, Mei; GREEF van der Jan; HANKEMEIER, Thomas; XU, Guowang. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker Discovery. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 26, p. 2823-2846, 2009.

COLOMBAN, Philippe; GOUADEC, Gwenael. Raman scattering theory and elements of Raman instrumentation. *In*: **Raman spectroscopy for soft matter applications**. Hoboken NJ: AMER, 2009; 11-29.

COOPER, John Britain. Chemometric analysis of Raman spectroscopic data for process control applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 46, n. 2, p. 231-247, 1999.

DINGARI, Narahara Chari; HOROWITZ, Gary L.; KANG, Jeon Woong; DASARI, Ramachandra R; BARMAN, Ishan. Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32406, 2012.

DREES, Julia C.; WU, Alan H. B. Analytical techniques. *In*: Clinical Chemistry, Techniques, Principles, Correlations and Techniques. Philadelphia: Bishop, Fody, Schoeff, 2010; 130-136.

EMBER, Katharine J. I.; HOEVE, Marieke A.; McAUGHTRIE, Sarah L.; BERGHOLT, Mads S.; DWYER, Benjamin J.; STEVENS, Molly M.; FAULDS, Karen; FORBES, Stuart J.; CAMPBELL, Colin J. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 2, n. 12, p. 1-10, 2017.

ENUE, Claes; GEORGIADIS Marios P.; JOHNSON Wesley O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 61-81, 2000.

ESPIRITO SANTO, Rafael. Utilização da Análise de Componentes Principais na compressão de imagens digitais. **Einstein**. v. 10, n. 2, p. 135-139, 2012.

FARIA, Dalva Lúcia Araújo; AFONSO Marisa Coutinho.; EDWARDS Howell G. M. Espectroscopia Raman: Uma nova luz no estudo de bens culturais. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 12, p. 249-467, 2002.

FELDER, Robin A.; BOYD, James C.; MARGREY K.; HOLMAN W. Robotics in the medical laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 1534-1543, 1990.

GARCEZ, Marcela Riccioppo; PEREIRA, Jaqueline Lopes; FONTANELLI, Mariane de Mello; MARCHIONI, Dirce Maria Lobo; FISBER, Mara. Prevalência de

dislipidemia segundo estado nutricional em amostra representativa de São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 6, p. 476-484, 2014.

GOETZ Marcel J.; COTE, Gerard L.; ERCKENS, Roel J.; MARCH, Wayne F.; MOTAMEDI, Massoud. Application of a multivariate technique to Raman spectra for quantification of body chemicals. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 42, n. 7, p. 728-731, 1995.

GOMES, Marcus Bastos; RACHEL, Bregman; MASTROIANNI, Gianna Kirztajn. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p 248-253, 2010.

GROMSKI, Piotr Sebastian; MUHAMADALI, Howbeer; ELLIS, David, I.; XU, Yun; CORREA Elon; TURNER, Michael L; GOODACRE, Royston. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10-23, 2015.

GROSS, Jorge L.; SILVEIRO, Sandra P.; CAMARGO, Joíza L.; REICHELT, Angela J.; AZEVEDO, Mirela J. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GUZEL, Omer; GUNER. Ebru Ilhan. ISO 15189 Accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 274-278, 2009.

HANLON, Eugene B.; MANOHARAN, Ramasamy; KOO, Tae-Woong; SHAFER, Karen; MOTZ, Jason T.; FITZMAURICE, Marvann; KRAMER, John R.; ITZKAN, Irving; DASARI, Ramachandra Rao; FELD, Michel S. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, 2000.

HE Ting; LIU, Xing; XU, Nana; LI, Ying; WU, QIAOYU; LIU, Meilin; YUAN, Hong. Diagnostic models of the pre-test probability of stable coronary artery disease: A systematic review. **Clinics**, v.72, n. 3, p. 188-196, 2017.

HONGYU, Kuang; SANDANIELO, Vera Lúcia Martins; OLIVEIRA, Gilmar Jorge Junior. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, n. 5, p. 83 -90, 2015.

JOHNSON, Cyanda Ann; LEVEY, Andrew S.; CORESH, Josef; LEVIN, Adeera; LAU, Joseph; EKNOYAN, Garabed Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part II. Glomerular filtration rate, proteinuria and other markers. **American Family Physician**, v. 70, n. 6, p. 1091-1097, 2004.

KONG, Kenny; KENDALL, Catherine; STONE, Nicholas; NOTINGHER, Ioan. Raman spectroscopy for medical diagnostics – From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 121-134, 2015.

KRAFTT, Christoph; NEUDERT, Lars; SIMAT, Thomas; SALZER, Reiner. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 7, p. 1529-1535, 2005.

LEHMANN, Erich Leo. The fisher, Neyman-Pearson theories of testing hypotheses: one theory or two? **Journal of the American Statical Association**, v. 88, n. 424, p. 1242-1249, 1993.

LEVESQUE, Josée; LAMARCHE Benoit. The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management. **Journal Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 1, p. 100-108, 2008.

LEWIS, Fraser I; TORGERSON, Paul R. A tutorial in estimating the prevalence of disease in humans and animals in the absence of a gold standard diagnostic. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 9, p. 1-8, 2012.

LIMA-OLIVEIRA, Gabriel; BARCELOS, Luiz Fernando; CORRÊA, José Abol; GUIMARÃES, João Ciribelli; NEUFELD, Paulo Murillo; GRINBERG, Irineu. Gestão de qualidade na fase pré-analítica parte I: análise crítica CLSI H3-A6. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 83-86, 2011.

LIPPI, Giuseppe; BASSI, Antonella; BROCCO, Giorgio; MONTAGNANA, Martina; SALVAGNO; Gian Luca; GUIDI, Gian Cesare. Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department: results of a 1-year experience. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1442-1443, 2006.

LOTTENBERG, Ana Maria Pita. Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LYKINA, Anastasiya A.; ARTEMEYEV, Dmitry N.; BRATCHENKO, Ivan A. Analysis of albumin Raman scattering registration efficiency from different volume and shape cuvette. **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2017.

MARTELLI, Anderson. Gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 363-368, 2011.

MENDES, Elizabete Maria; SUMITA, Massakazu Nairo. Seleção e qualificação de sistema analítico. *In*: **Gestão da fase analítica do laboratório I: como assegurar a qualidade na prática**. Rio de Janeiro: Mendes e Oliveira, 2010; 15-38.

MESCHER, Antony L. **Histologia Básica**, 13<sup>a</sup> ed. Indiana: Guanabara Koogan, 2013; 237-238.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. **Secretaria de Atenção à Saúde.** Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus. 2006; 64 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes\_mellitus\_cab16.pdf

MOMESSO, Denise Prado; COSTA, Rubens Carmo Filho; COSTA, João Luiz Ferreira; SADDY, Felipe; MESQUITA, Ayla; CALOMENI, Marcela; SILVA, Claudia dos Santos; FARRET, Jacqueline; VASQUES, Mariana Leon; SANTOS, Aline G.; CABRAL, Ana Paula Vieira; RIBEIRO, Dayane; REIS, Luciana; MUINO; Maria de Fátima M.; VITORINO, Roberta Santiago; MONTEIRO, Claudio Amorim; TINOCO, Evandro; VOLSCHAN, Andre. Impact of an inpatient multidisciplinary glucose control management program. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 514-522, 2018.

MOREIRA, Leonardo Marmo; SILVEIRA, Landulfo; SANTOS, Fábio V.; Lyon, Juliana P.; Rocha, Rick; ZÂNGARO, Renato Amaro; VILLAVERDE, Antônio Balbin; PACHECO, Marcos Tadeu Tavares. Raman spectroscopy: a powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. **Spectroscopy**, v. 22, n. 1, p. 1-19, 20089.

MOZAFFARIAN, Dariush. Global scourge of cardiovascular disease: time for health care systems reform and precision population health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p 26-28, 2017.

MUGNOL, Katia Cristina Ugolini; FERRAZ, Marcos Bosi. Sistema de informação como ferramenta de cálculo e gestão de custos em laboratórios de análises clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 95-102, 2006.

NEPOMUCENO, Maria de Fátima, RUGGIERO, Ana Célia. **Manual de Bioquímica – roteiros de análises bioquímicas quantitativas e qualitativas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

NUNES, Alexandra; MAGALHÃES, Sandra. Raman spectroscopy apllied to health sciences. *In*: **Raman Spectroscopy.** London: IntechOpen, 2018; 275-291.

NUNES, Cleiton Antonio; FREITAS, Matheus P.; PINHEIRO, Ana Carla Marques; BASTOS, Sabrina C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

PARKER, Fran S. Introduction and Brief Theory. *In* **Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry**. London: Plenum Press, 1983; 11-18.

PASSOS, Valéria Maria de Azerdo; BARRETO, Sandhi Maria; COSTA, Maria Fernanda Lima. Detection of renal dysfunction bases on serum creatinine levels in a Brazilian Community. The bambuí health and ageing study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v, 36, n. 3, p. 393-401, 2003.

PINHO, Matos de Pinho; MACHADO, Liliane Maria Messias; TORRES, Rosileide de Souza; CARMIN, Sérgio Eduardo Moura; MENDES, Wanderson André Alves; SILVA, Ana Carla Moreira; ARAÚJO, Marília de Souza; RAMOS, Edson Marcos Leal Soares. Síndrome metabólica e sua relação com escores de risco cardiovascular em adultos com doenças crônicas não transmissíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 12, n. 1, p: 22-30, 2014.

PLEBANI, Mario. Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 45, n. 6, p. 700-707, 2007.

PLEBANI, Mario. Towards a new paradigma in laboratory medicine: the five rights. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 54, n. 12, p. 1881-1891, 2016.

PORTO, Janaína Rodrigues; GOMES, Karina Braga; FERNANDES, Ana Paula; DOMINGUETI, Caroline Pereira. Avaliação da função renal na doença renal crônica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p 26-35, 2017.

PREMASIRI, Wijamunidurage R; CLARKE, Richard H.; WOMBLE, M. Edward. Urine analysis by laser Raman spectroscopy. **Lasers in Surgery Medicine**, v. 28, n. 4, p. 330-334, 2001.

QI, Dahu; BERGER, Andrew John. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy. **Applied Optics**, v. 46, n. 10, p. 1726-1734, 2007.

QU, Y. Jianan; WILSON, Brian C.; SURIA, David. Concentration measurements of multiple analytes in human sera by near-infrared laser Raman spectroscopy. **Applied Optics**, v. 38, n. 25, p. 5491-5498, 1999.

RAMASAMY, Indra. Update on the molecular biology of dyslipidemias. Clinica Chimica Acta, v. 454, p. 143-185, 2016.

RDC 166, Resolução da Diretoria Colegiada – Resolução No. 166, de 24 de julho de 2017. Brasília, Diário Oficial da União, 2017.

RDC 302, Resolução da Diretoria Colegiada – Resolução No. 302, de 13 de outubro de 2005. Brasília, Diário Oficial da União, 2005.

RDC 466, Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução No 466, de 12 de dezembro de 2012. Brasília, Diário Oficial da União, 2012.

ROCHE DIAGLOG, **Roche Diagnósticos**; https://dialog1.roche.com/pt/pt\_pt/elabdoc, acesso em 21 de Outubro de 2020.

ROSO, Camila Castro; BEUTER, Margrid; JACOBI, Caren da Silva; SILVA, Cristiane Trivisol; PERRANDO, Miriam da Silveira; BRUINSMA, Jamile Lais. Progressão da insuficiência renal crônica: percepções de pessoas em prédiálise. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 3, p. 581-588, 2013.

SAATKAMP, Cassiano Junior; ALMEIDA, Maurício Liberal; BISPO, Jeyce Aliana Martins; PINHEIRO, Antonio Luiz Barbosa; FERNANDES, Adriana Barrinha, SILVEIRA, Landulfo. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 3, p. 037001, 2016.

SALLE, Barbara de La; MEIJER, Piet; THOMAS, Annette; SIMUNDIC, Ana Maria Special issue on external quality assessment in laboratory medicine – current challenges and future trends. **Biochemia Medica**, v, 27, n. 1, p. 19-22, 2017.

SANTOS; Adriele R.; MENEZES, Denise B.; ELLENA, Javier; ANDRADE, Marcelo B. Aplicação da espectroscopia Raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 489-796, 2019.

SCIACOVELLI, Laura; KANE, Maurice O; SKAIK, Abdelwahab Younis; CACIAGLI, Patrizio; PELLEGRINI, Cristina; GIORGI, Da Rin; IVANOV, Agnes; GHYS, Timothy; PLEBANI, Mario. Quality indicators in laboratory medicine: from theory to pratice. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 49, n. 5, p. 835-844.

SILVEIRA, Landulfo; SATHAIAH, Sokki; ZÂNGARO, Renato Amaro; PACHECO, Marcos Tadeu Tavares; CHAVANTES, Maria C.; PASQUALUCCI, Carlos A. G. Correlation between near-infrared raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, n.4, p. 290-297, 2002.

SILVEIRA, Landulfo; BORGES, Rita de Cássia Fernandes; NAVARRO, Ricardo Scarparo; GIANNA, Hector Enrique; ZÂNGARO, Renato Amaro; PACHECO, Marcos Tadeu Tavares; FERNANDES, Adriana BArrinha. Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers Medical Science**, v. 32, n. 4, p, 787-795, 2017.

SIM, Julius; WRIGHT, Chris C. The Kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. **Physical Therapy**, v. 85, n. 3, p 257-268, 2005.

SOUZA, Camila Furtado; GROSS, Jorge Luiz; GERCHMAN, Fernando; LEITÃO, Cristiane Bauermann. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 5, p. 275-284, 2012.

STONE, Neil J.; ROBINSON, Jennifer G.; LICHTENSTEIN, Alice H.; MERZ, C Noel Bairey; BLUM, Conrad B.; ECKEL, Robert H.; GOLDBERG, Anne C.; GORDON,

David; LEVY, Daneil; JONES, Donald M. Lloyd; McBRIDE, Patrick; SCHWARTZ, Sanford J.; SHERO, Susan T.; SMITH, Sidney C.; WATSON, Karol; WILSON, Peter W. F. ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 129, n. 25, p. S1-S45 2014.

STRALEN, Karlijn J.; STEL, Vianda S.; REITSMA, Johannes B.; DEKKER, Friedo W.; ZOCCALI, Carmine; JAGER, Kitty J. Van. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. **Abc of epidemiology**, v. 75, p. 1257-1263, 2009.

TALARI, Abudi Chandra Sekhar; MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n. 1, p. 46-111, 2014.

ZIMMERA, Juliano; ANZANELLOB, Michel José. Um novo método para seleção de variáveis preditivas com base em índices de importância. **Production**, v. 24, n. 1, p. 84-93, 2014.