

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ELZO EVERTON DE SOUSA VIEIRA

**DIAGNÓSTICO DE PACIENTES DIABÉTICOS E HIPERTENSOS A PARTIR
DA ANÁLISE DA URINA VIA ESPECTROSCOPIA RAMAN**

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos – SP, Outubro 2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ELZO EVERTON DE SOUSA VIEIRA

**DIAGNÓSTICO DE PACIENTES DIABÉTICOS E HIPERTENSOS A PARTIR
DA ANÁLISE DA URINA VIA ESPECTROSCOPIA RAMAN**

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 do título de Doutor em Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Barrinha Moretti

Co-orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior

São José dos Campos – SP, Outubro 2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ELZO EVERTON DE SOUSA VIEIRA

DIAGNÓSTICO DE PACIENTES DIABÉTICOS E HIPERTENSOS A PARTIR DA ANÁLISE DA URINA VIA ESPECTROSCOPIA RAMAN

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

Aprovado pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Barrinha Moretti

Orientador

Doutorado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Adjanny Estela Santos de Sousa (externo)

Universidade do Estado do Pará

Prof. Dr. Darlisom Sousa Ferreira (externo)

Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Livia Helena M. da Silva Melo (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Rodrigo Alexis Lazo-Osório (suplente)

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Gisele Torrente (suplente)

Universidade do Estado do Amazonas

São José dos Campos, Outubro 2022

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

ELZO EVERTON DE SOUSA VIEIRA

Mestre em Bioengenharia, Tem MBA Executivo em Alta Gestão de Instituições de Ensino Superior, Especialista em Saúde e Segurança do Trabalho, Bacharel em Enfermagem. Minhas produções e interesses em Pesquisa estão voltados principalmente para os seguintes temas: paciente renal, paciente renal crônico, diagnóstico óptico em materiais biológicos e espectroscopia Raman.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V658d Vieira, Elzo Everton de Sousa
Diagnóstico de pacientes diabéticos e hipertensos a partir da análise da urina via espectroscopia Ramam / Elzo Everton de Sousa Viera. – 2022.
82f.: 30 cm.

Orientador: Adriana Barrinha Moretti.
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2022.
Bibliografia: f. 64-74.

1. Engenharia Biomédica. 2. Espectroscopia Ramam. 3. Diabetes. 4. Hipertensão. 5. Análise Bioquímica. 6. Urinálise. I. Título.

CDD 610.28

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para enfrentar todos os obstáculos encontrados nesta caminhada. Foram muitos momentos difíceis que passei para chegar até aqui. Fui acometido pela COVID-19 em 2021, fiquei grave e pedi muito a Deus para que eu pudesse realizar o meu sonho de concluir o meu curso de Doutorado e com muita fé e permissão de Deus consegui realizar o meu sonho de ser Doutor.

Em especial a Professora Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti, orientadora desta pesquisa, pela atenção, ensinamentos, incentivo, dedicação durante esses 4 anos. Minha eterna gratidão por me conduzir ao longo do meu doutoramento. Seus ensinamentos ficarão eternizados para sempre em minha memória.

Ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior, Co-Orientador desta pesquisa, que com toda sua competência, me direcionou e me ensinou os caminhos fundamentais de análise e interpretação dos meus dados. Fica aqui o meu registro de admiração pelo pesquisador és. Muito obrigado por toda a paciência, compreensão e dedicação nesta pesquisa.

À minha família, por estarem sempre ao meu lado, apoiando as minhas decisões em especial a minha mãe APARECIDA DE SOUSA VIEIRA e meu pai RUI MAR CARDOSO VIEIRA (IN MEMORIAN), que nos momentos de fraqueza me deram todo apoio para continuar nessa jornada. Tenho certeza, que meu pai ao lado do Senhor, tem me sustentado até aqui.

Ao Centro Universitário da Amazônia, UNAMA - SANTARÉM, por me oportunizar a ser docente do magistério superior e por todas as oportunidades a mim dadas. Hoje, estou como Reitor desta instituição, o que me faz crescer e amadurecer pessoalmente e profissionalmente.

A CAPES/PROSUP pelo apoio financeiro durante o Curso de Doutorado.

A Coordenação do Programa em Engenharia Biomédica, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro.

Ao Prof. Dr. Henrique Carvalho, pelo apoio e incentivo na construção do artigo científico da tese;

À minha amiga Jeyse Aliana Martins, foram muitos momentos juntos. Certamente, esses 4 anos de Doutorado com você, se tornaram mais leves, por ter a sua companhia.

À Direção do Hospital Municipal de Santarém, Hospital Regional do Baixo Amazonas e Secretaria Municipal de Saúde, por permitirem a realização da pesquisa.

A todos os funcionários da Clínica de Hemodiálise do Hospital Municipal de Santarém e Hospital Regional do Baixo Amazonas, pelo respeito, compreensão e ajuda durante a coleta de dados.

Aos pacientes que tiveram paciência e se mostraram dedicados e interessados em relação à pesquisa realizada. Deixo registrado aqui minha eterna gratidão, que sem vocês não seria possível à realização da mesma.

Aos Professores, Funcionários e colegas do Curso de Doutorado da Universidade Anhembi Morumbi – São José dos Campos - SP, pela convivência, amizade e companheirismo durante esta etapa importante de nossas vidas.

A Nídia Lúcia Macedo, Analista do Programa, que com toda a sua competência e paciência soube nos direcionar da melhor forma possível, fica aqui registrado o meu carinho e respeito pelo seu trabalho no programa;

E a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta pesquisa, minha eterna gratidão.

Muito obrigado São José dos Campos - SP, por me acolher durante todo esse tempo.

RESUMO

No Brasil e no mundo a prevalência de diabetes mellitus (DM) e a Hipertensão Arterial sistêmica (HAS) vem aumentando consideravelmente. Tanto a hiperglicemia quanto a HAS são fatores de risco independentes para doenças cardiovasculares, doenças renais e a sua coexistência aumenta em cerca de 7 vezes o risco de morte dos pacientes. A espectroscopia Raman destaca-se como ferramenta de análise dos componentes moleculares de diferentes tecidos, pois se sobressai às técnicas convencionais pela preservação da amostra, independência do uso de reagentes químicos e tempo reduzido de análise. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa de amostras de urina de pacientes saudáveis e diabéticos/hipertensos empregando-se o ensaio bioquímico convencional (espectrofotométrico) e a espectroscopia Raman, visando o diagnóstico. A urina de 40 indivíduos (20 saudáveis e 20 DM e HAS) foi examinada em um espectrômetro Raman dispersivo (excitação de 830 nm e potência de 350 mW). Os espectros Raman médios entre os dois grupos mostraram diferença significativa no pico referente à glicose. A análise exploratória por análise de componentes principais identificou diferenças espectrais entre os grupos, com picos atribuídos à glicose e proteínas com maior intensidade no grupo DM & HAS. Um modelo de regressão dos mínimos quadrados parciais, estimou a partir dos espectros raman a concentração dos biomarcadores ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total. A creatinina e glicose foram os biomarcadores que apresentaram o melhor coeficiente de correlação (r) entre as duas técnicas analisadas ($r = 0,68$ e $r = 0,98$, respectivamente), ambas com 8 variáveis latentes (LVs) e raiz quadrada média erro de validação cruzada (RMSEcv) = 3,6 e 5,1 mmol/L (41 e 92 mg/dL), respectivamente. A análise discriminante (PLS-DA) utilizando todo o espectro Raman foi capaz de diferenciar as amostras dos grupos em estudo, com acurácia superior (81,5%). A precisão referente as concentrações previstas pela regressão PLS foi de (69,85), maior em relação ao modelo LDA que foi de 60%, onde os valores de concentração da análise espectroscópica foram usados. Os resultados indicaram que modelos espectrais baseados em PLS aplicados a espectros Raman pode ser uma ferramenta para diferenciar indivíduos saudáveis e com diabetes e hipertensão arterial, visando triagem populacional, em urinálise. Neste sentido, a detecção precoce de alterações na urina possibilitaria encaminhamento destes pacientes para realização de exames mais específicos, com menores taxas de erro. Este fato pode impactar no ajuste adequado da terapêutica, e conseqüentemente, na redução ou retardo de complicações do diabetes e da hipertensão, o que impactariam diretamente nos custos envolvidos, principalmente relacionados ao SUS e na qualidade de vida destes pacientes.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica, Espectroscopia Raman; urinálise; diagnóstico; diabetes; hipertensão; análise bioquímica; quantificação; análise discriminante.

DIAGNOSIS OF DIABETIC AND HYPERTENSIVE PATIENTS FROM URINE ANALYSIS VIA RAMAN SPECTROSCOPY

ABSTRACT

The prevalence of diabetes mellitus (DM) and systemic arterial hypertension (HBP) has been increasing considerably in Brazil and around the world. Both DM & HBP are independent risk factors for cardiovascular and kidney diseases and the odd of death is 7-fold higher in patients with the two conditions. When compared to conventional techniques, the Raman spectroscopy is an important tool for analyzing the molecular components of different tissues as it preserves the samples, does not require the use of chemical reagents, and analysis time is reduced. Thus, the aim of this study was to comparatively analyze urine samples from healthy and diabetic/hypertensive patients using the conventional biochemical assay (spectrophotometric method) and Raman spectroscopy to obtain a diagnosis. The urine samples of 40 individuals (20 healthy individuals and 20 individuals with DM & HBP) was examined in a dispersive Raman spectrometer (at 830 nm excitation and 350 mW power). The average Raman spectra between the two groups showed a significant difference in the peak referring to glucose. Exploratory analysis by principal component analysis identified spectral differences between the groups, in which the peaks attributed to glucose and proteins were more intense in the DM & HBP group. A partial least-squares regression model estimated the concentration of the biomarkers for urea, creatinine, glucose, phosphate, and total protein from the Raman spectra. The biomarkers that showed the best correlation coefficient (r) between the two techniques used was creatinine and glucose ($r = 0.68$ and $r = 0.98$, respectively), both with 8 latent variables (LVs), and root mean square error cross-validation (RMSEcv) was 3.6 and 5.1 mmol/L (41 and 92 mg/dL), respectively. Discriminant analysis (PLS-DA) using the entire Raman spectrum was able to differentiate the samples from the groups under study with an accuracy of 81.5%. The precision regarding the concentrations predicted by the PLS regression was 69.85, higher than the LDA model, which was 60%, where the concentration values of the spectroscopic analysis were used. The results indicated that spectral models based on PLS applied to Raman spectra can be a tool to differentiate healthy individuals from those with diabetes and arterial hypertension for population screening, in urinalysis. In this sense, the early detection of alterations in urine would make it possible to refer these patients other specialists for more specific exams, with lower error rates. These results may help provide an appropriate adjustment of therapy and consequently, reduce or delay complications of diabetes and hypertension, which would directly impact costs of treatments, particularly those related to SUS, and improve the quality of life of these patients.

Keywords: Biomedical engineering; Raman spectroscopy; urinalysis; diagnosis; diabetes; hypertension; biochemical analysis; quantification; discriminant analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Objetivo geral	22
1.1.2 Objetivos específicos	22
1.2 JUSTIFICATIVA.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 FISILOGIA RENAL.....	25
2.1.1 Filtração Glomerular	25
2.1.2 Reabsorção Tubular	26
2.1.3 Secreção Tubular	27
2.1.4 Formação da urina.....	28
2.1.5 Composição da urina.....	29
2.1.6 Volume da urina.....	29
2.1.7 Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica e os Biomarcadores relacionados a análise da função renal.....	30
2.1.8 – Automação em Urinálise.....	37
2.2 Espectroscopia Raman: Fundamentação técnica e análise em fluídos biológicos com ênfase na urina.....	39
2.3 Quantificação, discriminação e classificação através de ferramentas estatísticas	41
2.3.1 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i> - PLS)	41
2.3.2 Análise dos Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i> - PCA)	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45

3.1 Delineamento do Estudo.....	45
3.2 Obtenção das amostras de urina e análise quimiométrica bioquímica.....	45
3.3 Coleta dos espectros.....	48
3.4 Análise de dados: Modelos de regressão linear para análise quantitativa e discriminação	49
4. RESULTADOS.....	53
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A	79
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	82
APÊNDICE B – FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO - ANAMNESE	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura.1 Diagrama ilustrativo para demonstrar o número de elegibilidade da amostra avaliada, e os espectros totais incluídos e excluídos do estudo.	44
Figura.2 Diagrama dos dados de configuração experimental.....	44
Figura.3 Espectros Raman médios dos grupos CT e DM & HAS e espectro de diferença (DM & HAS e CT). As atribuições dos principais picos foram detalhadas no texto. Os espectros foram deslocados para maior clareza. GLI: glicose; URE: uréia; CRE: creatinina; FOS: fosfato; PRO: proteína total.....	51
Figura.4 Gráfico das primeiras seis variáveis componentes principais (Scores e PCs) extraídas do conjunto de dados Raman. As atribuições bioquímicas observadas nos Scores foram baseadas nas posições das bandas Raman comparadas com a literatura. PC3, PC4 e PC5 apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (teste t, $p < 0,05^*$)..	54
Figura.5 Correlação entre as concentrações estimadas dos biomarcadores ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total na urina determinada usando modelos espectrais baseados em regressão PLS com validação cruzada leave-one-out versus as concentrações determinadas pela espectrofotometria.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela.1 Principais especificações técnicas e detalhes do equipamento espectrofotométrico automatizado utilizado (Atellica CH 930 Analyzer).....	50
Tabela.2 Limite de detecção do analito (LOD) e linearidade dos ensaios químicos na urina de acordo com o fabricante do kit comercial.	57
Tabela.3 Características gerais dos participantes da pesquisa do grupo controle	57
Tabela.4 Características gerais dos participantes da pesquisa do grupo de diabéticos e hipertensos.....	57
Tabela.5 Concentração dos principais biomarcadores da urina dos grupos CT e DM & HAS ensaiados por espectrofotometria. Valor de referência (VR) de Wu (2006) – SI convertido (mmol/L)	57
Tabela.6 Resultados da classificação em grupos CT e DM & HAS utilizando o PLS-DA aplicado às concentrações dos biomarcadores obtidos por análise espectrofotométrica. A classificação usando espectros Raman foi realizada de duas maneiras diferentes com base nos valores de concentração dos biomarcadores previstos pelo PLS, e análise de todo o espectro Raman, considerando todas as informações espectrais.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CT – Controle

DCV - Doença Cardiovascular

DM – Diabetes Mellitus

EC – Espectrofotometria Convencional

ER – Espectroscopia Raman

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

MS – Ministério da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais

PLS – Mínimos Quadrados Parciais

PLS- DA – PLS - Análise Discriminante

RMSE_{cv} – Erro Quadrático Médio da Validação Cruzada

SUS – Sistema Único de Saúde

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

LV – Variável Latente

VR – Valor de Referência

Un. Arb – Unidade Arbitrária

1. INTRODUÇÃO

A urina é o fluido corporal mais comumente utilizado para se determinar uma condição de saúde ou de doença em um indivíduo ou grupo (Ridley, 2018), sendo formada por produtos do metabolismo e substâncias que estão em excesso no organismo, pode ser coletada de maneira não invasiva e relativamente em grandes volumes (Harlope et al., 2016). Na avaliação laboratorial da urina, estão incluídos suas características físico-químicas (cor, densidade e volume), parâmetros bioquímicos (pH, sangue, glicose, cetonas, bilirrubina, urobilinogênio e proteína) e a avaliação microscópica dos sedimentos (hemácias, leucócitos, organismos, células epiteliais, cristais e elencos) (Reine & Langston, 2005).

Os constituintes químicos presente na urina são geralmente quantificados utilizando a urina de 24h, técnica que traz consigo um grande desconforto em relação ao tempo de coleta caracterizando-se uma desvantagem que pode ser minimizada através da utilização do método de urina tipo 1 de jato médio, que avalia os constituintes presentes no material analisado em uma única medição (Shapiro et al., 2011).

Em geral, a urina consiste basicamente de ureia e outros compostos orgânicos e químicos dissolvidos em água, em especial creatinina e ácido úrico (Ridley, 2018). A creatinina é um dos principais componentes da urina humana, trata-se de um produto do metabolismo muscular. É comumente utilizado para o teste que mede a função da filtração renal (Wang et al., 2010). A taxa de filtração glomerular (TFG) é a medida da depuração de uma substância que é filtrada livremente pelos glomérulos e não sofre reabsorção ou secreção tubular, por isso é comumente usada como a medida padrão da avaliação da função renal. É um indicador importante para detecção, avaliação e tratamento da doença renal crônica (Soares et al., 2009).

Conforme Berg et al. (2015) a ureia é um dos principais metabólitos contendo nitrogênio nos sistemas biológicos. Em humanos, a síntese de ureia é a principal via de remoção do nitrogênio residual gerado pelo metabolismo de proteínas e aminoácidos. No corpo humano, a ureia é o principal produto final do metabolismo do nitrogênio e é principalmente removida do corpo na urina, mas também é secretada nos fluidos corporais, como sangue, suor e saliva. Alterações na concentração de ureia no sangue, soro ou urina estão relacionadas com diferentes patologias como

insuficiência renal, hiperpirexia, leucemia, doenças diarreicas, diabetes mellitus e hipertireoidismo (Chirizzi et al., 2011).

A proteinúria é uma das manifestações clínicas mais comuns da nefropatia diabética e se correlaciona intimamente com a trans-diferenciação de células mesenquimais. Apesar da membrana basal ser uma barreira que evita a eliminação de moléculas maiores, uma pequena quantidade de proteínas passa pelos capilares da membrana basal para o filtrado glomerular, podendo agravar o quadro da nefropatia diabética e evoluindo para a doença renal terminal. Deste modo, a nefropatia diabética é considerada uma doença celular podocitária (Montero et al., 2016).

A hipertensão arterial sistêmica é o fator de risco modificável mais importante para todas as causas de morbimortalidade em todo o mundo e está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Menos da metade das pessoas com hipertensão está ciente de sua condição, e muitos outros sabem, mas não são tratados ou tratados inadequadamente, embora o tratamento bem-sucedido da hipertensão reduza a carga global de doenças e mortalidade (Oparil et al., 2018). Os néfrons, uma das unidades funcionais do rim que filtram o sangue, são abastecidos com uma densa rede de vasos sanguíneos e grandes volumes de fluxo sanguíneo através deles. Com o passar do tempo, a pressão alta pode fazer com que as artérias ao redor dos rins se contraíam e se estreitem e essas artérias danificadas não são capazes de fornecer sangue suficiente para o tecido renal (CDC, 2022). O diagnóstico do Diabetes Mellitus (DM) é baseado nas concentrações de glicose no sangue e urina. Os métodos mais tradicionais de coleta invasiva de sangue, como método bioquímico colorimétrico vêm sendo substituídos por estratégias não invasivas como uso da fotônica (De Souza Vieira et al., 2017, Arefin et al., 2018, Novikov, 2018).

A glicose pode ser encontrada na urina quando é excretada do sangue em níveis elevados e, como resultado, esse líquido vem sendo investigado para o diagnóstico de DM. A glicosúria se torna positiva quando a sua concentração sérica é superior a 180mg/dL em pacientes com função renal normal e com valores ainda mais elevados em pacientes com nefropatia diabética. Existem vários interferentes na medida da glicose na urina como, por exemplo, o volume (Bruen et al., 2017).

Em condições normais quase toda glicose filtrada pelos glomérulos é reabsorvida no túbulo contornado proximal, assim a urina contém quantidades mínimas de glicose. As concentrações de glicose no sangue são usadas para

diagnosticar diabetes mellitus (DM). A hiperglicemia por um período prolongado pode causar alterações vasculares nos rins. No entanto, a causa exata é desconhecida, o controle incorreto do açúcar no sangue e da pressão arterial são conhecidos por aumentar o risco de dano renal (CDC, 2022). A reabsorção ocorre por transporte ativo. Quando a glicose sérica alcança níveis entre 160 a 180 mg/dl a reabsorção tubular renal torna-se insuficiente para reabsorver toda glicose e esta passa a ser detectada na urina. Sendo importante salientar que doenças que afetam a reabsorção tubular, algumas lesões do sistema nervoso central e patologias da tireóide pode haver glicosúria sem que o paciente apresente elevação da glicose sérica (Abensur, 2011).

O fosfato é um ânion intracelular mais abundante no corpo e é um componente importante em múltiplos processos fisiológicos que afetam muitos sistemas de órgãos diferentes (Peppers et al., 1991). Níveis elevados de fosfato sérico são geralmente encontrados em pacientes com doença renal crônica moderada a grave, e estão associados à calcificação valvular e vascular cardíaca, levando ao aumento de eventos cardiovasculares e mortalidade (Foley, 2009).

A ER é uma técnica de espectroscopia óptica baseada no espalhamento inelástico da luz e seus modos vibracionais, e que pode ser empregada para identificação bioquímica amostral (impressão digital), de maneira in vivo, em tempo real e de forma não invasiva. Além disso, pode ser utilizada in vitro para avaliar os componentes bioquímicos presentes em fluídos biológicos, dispensando o auxílio de produtos químicos e reagentes, além de ser uma técnica com alguns benefícios em relação às técnicas bioquímicas tradicionais, dada sua especificidade molecular e a possibilidade de análise quantitativa, o que minimiza o custo e reduz os possíveis erros analíticos em relação, por exemplo, ao método espectrofotométrico usualmente empregado nas análises laboratoriais convencionais (Bispo et al., 2013, De Souza Vieira et al., 2017, Giansante et al., 2022).

A ER já vem sendo investigada pelo potencial de análise da urina, de modo a auxiliar no diagnóstico precoce através das alterações desses biomarcadores, devido a suplementação nutricional, infecções do trato urinário e outras doenças, inclusive renal crônica e câncer de bexiga, com o benefício de possuir rápida análise em amostras individuais (McMurdy et al., 2003, Bispo et al., 2013, Saatkamp et al., 2016, De Souza Vieira et al., 2017, Moreira et al., 2020, Žukovskaja et al., 2020, Hu et al., 2021).

Os benefícios da técnica de ER, quando comparado com as técnicas bioquímicas tradicionais, residem nas possibilidades de detectar biomoléculas selecionadas sem a necessidade de reagentes (custos reduzidos), detectando e quantificando vários bioquímicos ao mesmo tempo devido à natureza multivariada de um único Sinal Raman (rapidez), que pode reduzir possíveis erros analíticos (Giansante et al., 2022) , uma vez que as moléculas associadas a alguns doentes possuem propriedades espectrais muito específicas e são facilmente detectadas por espalhamento Raman (Eberhardt et al., 2015). A espectroscopia Raman tem sido usada para análise de soro e diagnóstico de diferentes doenças, como endometriose, doença de Huntington, COVID-19 e cirrose (Guleken, 2022; Staritzbichler, 2021).

Nesta pesquisa, foram avaliados os principais biomarcadores presentes na urina de voluntários saudáveis (grupo controle – CT), e de pacientes diabéticos e hipertensos (grupo DM e HAS) sem função renal comprometida, com o objetivo de comparar a espectroscopia raman com o método bioquímico convencional (espectrofotometria – padrão-ouro) visando a classificação e o diagnóstico, uma vez que esses pacientes estão em risco de desenvolver doença renal.

No presente estudo foi realizada uma análise exploratória a partir da avaliação de componentes principais (PCA) para descrever as diferenças espectrais entre os grupos e correlacionar essas diferenças com as mudanças na composição da urina devido ao DM e HAS. Além disso, foi desenvolvido um modelo multivariado baseado em regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com o objetivo de prever as concentrações dos biomarcadores em relação ao método padrão e classificar os espectros nos grupos clínicos estudados.

A inovação do presente estudo inclui que cinco biomarcadores foram avaliados na urina: ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total, enquanto estudos anteriores avaliaram apenas ureia, creatinina e glicose (De Souza et al, 2017 ; Bispo et al, 2013). Este grupo de pesquisadores empregaram um modelo de classificação baseado na análise discriminante quadrática (QDA) aplicada ao Raman/PCA para classificar espectros em um dos quatro grupos com base em observações clínicas (controle, DM + HAS sem complicações, DM + HAS com complicações e diálise) (De Souza et al, 2017 ; Bispo et al, 2013). No modelo proposto, a acurácia da classificação obtida para o grupo DM e HAS (sem complicações) foi de 32%. A fim de melhorar a

classificação obtida nesses estudos anteriores, considerando que na maioria dos casos esses pacientes com DM e HAS são assintomáticos, empregamos a análise discriminante PLS aplicada aos espectros Raman na urina para classificar os indivíduos com DM e HAS de saudáveis (controle). Além disso, outra característica inovadora deste estudo foi realizar a classificação utilizando a concentração dos biomarcadores do ensaio de espectrofotometria convencional e as concentrações estimadas pelo modelo PLS aplicado aos espectros Raman visando o diagnóstico (triagem populacional).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Realizar análise bioquímica comparativa entre a espectrofotometria convencional e a espectroscopia Raman na urina de pacientes saudáveis e diabéticos e hipertensos, visando ao diagnóstico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter modelos de quantificação dos componentes bioquímicos do estudo (ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total) baseados em modelos de regressão multivariada por análise de PCA e PLS aplicados aos espectros Raman da urina utilizando as concentrações determinadas pelo método analítico tradicional (espectrofotometria);
- Classificar as amostras em grupo de pacientes saudáveis e diabéticos e hipertensos utilizando as concentrações obtidas através da PLS e PCA.
- Obter modelos de discriminação baseados nas técnicas PCA-DA e PLS-DA para classificação das amostras em grupo de pacientes saudáveis e grupo de diabéticos e hipertensos.

1.2 JUSTIFICATIVA

Como está escrito na Constituição do Brasil: “A saúde é direito de todos e dever do estado”. É o parâmetro indispensável para mensurar a qualidade de vida do ser humano. A assistência à saúde é uma das principais necessidades básicas que um sistema deve oferecer aos seus cidadãos. No Brasil, o SUS foi desenvolvido com o objetivo de fornecer de forma gratuita serviços de saúde, no tocante prevenção e tratamento de enfermidades para todos os brasileiros, porém, o que ainda se observa na prática, é que esse sistema, ainda apresenta fragilidades no âmbito do acesso ao mesmo.

Ao longo dos anos devido a diversos fatores, como o envelhecimento da população, aumento no número de diabéticos, hipertensos, aumentou a demanda pelo atendimento, porém devido à falta de recursos materiais e profissionais, consequentemente a precariedade do sistema, vem à tona.

Diante do aumento considerável de pacientes com lesão renal a partir de diabetes e hipertensão, e considerando as dificuldades do SUS relacionado a acesso aos serviços de saúde básicos, como por exemplo, exames de função renal, desenvolver técnicas utilizando o diagnóstico óptico, pode ser uma forma de atuação na prevenção de lesões renais, visto que métodos ópticos pode trazer vantagens, em relação a técnicas convencionais, pois, não dependem de reações químicas ou tempos enzimáticos, permitindo avaliação em tempo real e com mínima preparação das amostras.

Analisando as pesquisas já desenvolvidas utilizando-se a ER neste segmento (Bispo et al., 2013; De Souza Vieira et al., 2017), no presente estudo foi realizada uma análise comparativa de amostras de urina de pacientes saudáveis e diabéticos/hipertensos empregando-se o ensaio bioquímico convencional (espectrofotométrico) e a espectroscopia Raman, visando o diagnóstico.

Neste sentido, a detecção precoce de alterações na urina possibilitaria o encaminhamento destes pacientes para realização de exames mais específicos, com menores taxas de erro. Este fato pode impactar no ajuste adequado da terapêutica, e consequentemente, na redução ou retardo de complicações do diabetes e da

hipertensão, o que impactariam diretamente nos custos envolvidos, principalmente relacionados ao SUS e na qualidade de vida destes pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISILOGIA RENAL

2.1.1 Filtração Glomerular

A membrana do glomérulo é formada por três camadas: camadas de células endoteliais, que é a mais interna; membrana basal, a camada intermediária, formada por proteoglicanos e fibras colágenas e por último, camada de células epiteliais, a mais externa formada por prolongamentos digitiformes (estes prolongamentos ficam interdigitados com as células adjacentes, abrindo fendas nos prolongamentos contínuos, possibilitando a passagem de líquido para a cápsula de Bowman). Há presença de poros em fenda e de pertuitos, conhecida como fenestras, na camada de células endoteliais. A camada basal é extremamente porosa devido a sua constituição por uma malha de fibras; assim através das fenestras, dos poros em fenda e dos espaços na membrana basal que o líquido é filtrado do capilar para a cápsula de Bowman e a cápsula chega ao sistema tubular (Guyton,1988).

A membrana glomerular possui uma particularidade importante que é ser extremamente permeável à água e a pequenos solutos moleculares; é impermeável a célula sanguínea e quase impermeável às proteínas. A pressão hidrostática (originada pelo tamanho menor das arteríolas eferentes e capilares glomerulares) intensifica a filtração; a pressão vence as pressões opostas vindas do líquido presente na cápsula de Bowman e da pressão colóide das proteínas plasmáticas não filtradas presentes nos capilares glomerulares. O fluxo sanguíneo nos rins sofre influência do sistema renina angiotensina aldosterona, ativado quando a mácula densa (no aparelho justaglomerular) detecta alterações no nível plasmático e na pressão sanguínea, por exemplo, quando a mácula detecta que o nível de sódio abaixou, uma cascata de reações no sistema renina angiotensina aldosterona é ativada (Guyton, 1988; Guyton, 2008).

Os rins secretam a enzima renina que reage com o angiotensinogênio, que produz a angiotensina I (inerte); esta atravessa os pulmões e se torna ativa, levando o nome de angiotensina II. A função desta é reequilibrar o fluxo sanguíneo, podendo

ativar de três maneiras: vasoconstrição das arteríolas renais, estimulação da reabsorção do sódio no túbulo proximal e desencadeamento da liberação da aldosterona pelo córtex suprarrenal. A secreção da renina para quando a pressão sanguínea aumenta e os níveis plasmáticos de sódio se normalizam e por consequência, a conversão de angiotensina I em II também se cessa. Devido a todos estes mecanismos existentes, sabe-se que 120mL de água contendo substâncias de menor peso molecular são filtradas, por cerca de dois milhões de glomérulos (Guyton, 1988; Guyton, 2008).

2.1.2 Reabsorção Tubular

É um processo muito importante, pois as substâncias essenciais, de baixo peso molecular contidas no ultrafiltrado podem ser reabsorvidas pelos rins. O ultrafiltrado plasmático entra nos túbulo contorcido proximal e a reabsorção de determinadas substâncias começa através de mecanismos de transporte celular, conhecidos como transportes ativo e passivo; no ativo, a substância se liga a uma proteína transportadora presente nas membranas dos túbulos renais, e com a energia eletroquímica proveniente dessa interação, a substância atravessa a membrana chegando na corrente sanguínea. Através desse mecanismo, substâncias como glicose, sais, são reabsorvidos no túbulo contorcido proximal, cloreto na alça ascendente de Henle e sódio no túbulo contorcido distal (Strasinger, 2000).

O transporte passivo depende das diferenças de concentração ou de potencial elétrico nos lados opostos da membrana, pois são estes quesitos responsáveis pelo movimento de moléculas através da membrana; apenas a alça ascendente de Henle não faz este transporte por ser impermeável a água (Strasinger, 2000). A ureia é reabsorvida dessa maneira no túbulo contorcido proximal e na alça ascendente de Henle, e a reabsorção passiva do sódio acompanha o transporte ativo do cloreto na alça ascendente de Henle (Vandel, 1980). Os dois tipos de transporte podem ser influenciados pela concentração das substâncias que serão transportadas; quando uma substância, que é completamente reabsorvida, atinge um nível de concentração acima do normal, a concentração do filtrado ultrapassa a capacidade reabsorvitiva tubular máxima e a substância passa a aparecer na urina (a concentração plasmática

na qual o transporte ativo cessa é chamada de limiar renal). O conhecimento do limiar renal e da concentração pode ser usado para fazer a distinção entre excesso de filtração de soluto e lesão no túbulo renal (Strasinger, 2000).

2.1.3 Secreção Tubular

A secreção tubular possui duas funções importantes, eliminar resíduos não filtrados pelos glomérulos e regular o equilíbrio ácido básico do organismo (secreção de íons hidrogênio) (Strasinger, 2000). Substâncias como medicamentos não são filtrados pelo glomérulo por serem ligadas a proteínas plasmáticas; quando substâncias ligadas a proteínas entram nos capilares peritubulares, acabam dissociando-se de suas proteínas, transportando-se para o filtrado pelas células tubulares (Strasinger, 2000). Os íons bicarbonato é um componente importante para o tamponamento do sangue, um dos fatores essenciais para a manutenção do pH sanguíneo em nível normal, o equivalente a 7,4; outro fator é eliminar o excesso de ácido formado pela ingestão alimentar e pelo metabolismo orgânico (os íons bicarbonato devem ser filtrados pelos glomérulos e retornar rapidamente para o sangue) (Strasinger, 2000).

Os íons hidrogênio auxiliam os íons bicarbonato ao impedi-los de serem excretados na urina e provocando seu retorno ao plasma (quase toda quantidade de íons bicarbonato é reabsorvido); este processo ocorre no túbulo contorcido proximal. A secreção tubular elimina o excesso de íons hidrogênio; quando secretado, une-se a um íon fosfato filtrado e acaba sendo eliminado; ao reagir com amônia, produzida e secretada pelas células do túbulo contorcido distal também é secretado. (Strasinger, 2000; Guyton, 2008).

Os três processos ocorrem de forma simultânea; se houver alguma interrupção, poderá acarretar um distúrbio conhecido como acidose metabólica ou a incapacidade de responder ao teste diagnóstico por acidificação ou de produzir urina ácida. (Strasinger, 2000). A intensidade do fluxo urinário: em condições fisiológicas normais, a quantidade de urina final formada é 1 mL/min, cerca 1/125 da quantidade de filtrado glomerular que é formado por minuto. Os componentes encontrados em 1mL de urina formada são: metade da quantidade de ureia que se encontrava presente no filtrado,

toda creatinina, grande quantidades de fosfato, potássio, ácido úrico, sulfatos, nitratos e fenóis; apesar do processo de reabsorção, grande quantidade dos produtos do metabolismo não conseguem ser reabsorvidos e acabam sendo eliminados pela urina (Guyton,1988).

2.1.4 Formação da urina

A urina é continuamente formada pelos rins a partir da filtração glomerular. Trata-se, na realidade de um ultrafiltrado do plasma, do qual foram reabsorvidos glicose, aminoácidos, água e outras substâncias essenciais ao metabolismo do organismo. A excreção de diferentes substâncias na urina representa a soma algébrica de três processos renais: filtração glomerular (-) reabsorção de substâncias dos túbulos renais para o sangue (+) secreção de substância do sangue para túbulos renais (Henry, 1999; Guyton, 2008).

O exame da urina como ferramenta de diagnóstico da saúde sistêmica abrange mais de 8.000 anos de história humana (Armstrong, 2007). Nas últimas décadas, a detecção e caracterização de tais componentes da urina tem gerado muito interesse entre a comunidade científica e a clínica. A especificidade e sensibilidade dessas tecnologias são de suma importância, pois a maioria das técnicas requer pequenas quantidades de amostras concentradas para análise (Normanno, 2018).

A urina contém vários tipos de células, incluindo células epiteliais, células derivadas do rim, glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e células uroteliais, bem como material genético, proteínas, peptídeos e compostos inorgânicos. Cada biomarcador apresenta suas vantagens e desvantagens, e a seleção de biomarcadores pode depender do tipo de tecnologia disponível (Bryzgunova et al., 2006).

O exame macroscópico da urina (uroscopia) foi realizado ao longo da antiguidade e idade média; a urina era examinada visualmente, cheirada e até mesmo provada para determinar o estado interno do corpo. O exame microscópico da urina se desenvolveu durante os séculos 19 e 20 e, em 1933, Pitts desenvolveu marcadores de urina para determinar como o rim funciona (Pitts, 1933).

2.1.5 Composição da urina

Em geral, a urina é constituída por ureia e outras substâncias químicas orgânicas e inorgânicas dissolvidas em água. Podem ocorrer grandes variações na concentração dessas substâncias, devido à influências de fatores como ingestão alimentar, atividade física, metabolismo orgânico, função endócrina e até mesmo posição do corpo. A ureia, resíduo metabólico produzido no fígado a partir da utilização de proteínas e aminoácidos, representa quase metade dos corpos sólidos dissolvidos na urina. Entre outras substâncias orgânicas estão a creatinina e o ácido úrico. O principal componente inorgânico dissolvido na urina é o cloreto, seguido pelo sódio e potássio. Também estão presentes outros compostos químicos inorgânicos, em quantidade ínfimas. A concentração desses compostos inorgânicos sofre grande influência da ingestão alimentar, o que dificulta o estabelecimento de níveis normais. Outras substâncias encontradas são: hormônios, vitaminas e medicamentos. A urina também pode conter elementos que não fazem parte do filtrado plasmático inicial, como células, cristais, muco e bactérias, que em níveis elevados, podem ser indício de doença (Strasinger, 2000; Guyton, 2008).

2.1.6 Volume da urina

A água é o principal constituinte do organismo e, portanto, a quantidade excretada, em geral, é determinada pelo estado de hidratação do corpo. Os fatores que influenciam o volume da urina são: ingestão de líquidos, perda de líquidos por fontes não renais, variações na secreção do hormônio antidiurético e necessidade de excretar grandes quantidades de solutos, como glicose ou sais. Levando-se esses fatores em consideração, pode-se observar que, embora cerca de 180 L de filtrado glomerular são formados a cada dia, menos de 1% dessa quantidade, cerca de 1,8 L por dia, é eliminado na urina. Apesar disso, esse pequeno volume contém a maior parte dos produtos finais do metabolismo, como: ureia, ácido úrico, creatinina, fosfatos, sulfatos e excesso de ácidos. A anúria (interrupção completa do fluxo urinário), oligúria (acentuada redução do fluxo urinário), poliúria (grande aumento do fluxo urinário) e disúria (micção dolorosa) podem ser achados observados,

respectivamente, nas síndromes nefróticas crônicas, glomerulonefrites agudas, diabetes mellitus e durante a eliminação de cálculos renais (Strasinger, 2000).

2.1.7 Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica e os Biomarcadores relacionados a análise da função renal

O diabetes mellitus, caracterizado por hiperglicemia, é um importante fator de risco para doença cardiovascular (DCV), que é a causa mais comum de morte entre adultos com diabetes mellitus. O DM também está associado a alta morbidade devido a uma ampla gama de complicações, como retinopatia, nefropatia, neuropatia e doença cardiovascular (Fowler, 2008). Em 1999, a *American Heart Association* (AHA) e a *American Diabetes Association* (ADA) publicaram uma declaração conjunta focada na prevenção de DCV no diabetes mellitus. Em 2007, a AHA e a ADA publicaram novamente um conjunto combinado de recomendações focadas na prevenção primária de DCV no diabetes mellitus (Buse et al., 2007).

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA, 2015) o rastreamento e o diagnóstico do diabetes mellitus mudaram, com a inclusão da hemoglobina glicada (A1C) de pelo menos 6,5% nos critérios diagnósticos do diabetes mellitus tipo 2, semelhante ao critério utilizado pela Sociedade Brasileira de Diabetes que adota a (A1C) maior ou igual a 6,5% (Cobas et al; 2022). Essa mudança nos critérios identificou subconjuntos separados de pacientes recém-diagnosticados com diabetes mellitus enquanto a epidemia geral de diabetes mellitus continua, com um aumento de 75% no número de indivíduos afetados com diabetes mellitus em todas as faixas etárias de 1988 a 2010 (Cheng et al., 2013). Menos da metade dos adultos norte-americanos atendem às diretrizes recomendadas para o tratamento do diabetes mellitus, ressaltando a magnitude da carga de saúde pública do diabetes mellitus tipo 2 (Ali et al., 2013).

A prevalência do DM vem crescendo mundialmente, configurando-se atualmente como uma epidemia resultante, em grande parte, do envelhecimento da população. Contudo, o sedentarismo, a alimentação inadequada e o aumento da obesidade também são responsáveis pela expansão global do diabetes, representando 9% dos gastos hospitalares do SUS com hospitalizações atribuíveis ao

DM, o que incorre em altos encargos para os sistemas de saúde (Schmidt et al., 2009). Estudos revelam que indivíduos diabéticos apresentam cerca de 2,4 vezes mais despesas médicas que indivíduos não diabéticos da mesma idade, raça e sexo (Duarte et al., 2013).

O DM apresenta alta morbimortalidade e perda importante na qualidade de vida. É a principal causa de insuficiência renal e amputação de membros inferiores (Souza, 2013). O DM está entre as principais causas de cegueira devido a retinopatias e doença cardiovascular em todo o mundo, incluindo doenças coronarianas e acidentes vasculares encefálicos. A maioria das consequências do diabetes resulta dessas complicações micro e macrovasculares (Toscano, 2004).

O DM é um problema mundial de saúde pública que requer um controle permanente em todos os níveis de atenção à saúde (Almeida; Cárdenas, 2013). Faz parte das Doenças Crônicas Não Transmissíveis de maior prevalência e incidência no mundo, não sendo diferente no Brasil. É responsável por vários danos à vida do paciente, à comunidade e aos serviços de saúde. Tendo em vista que é uma doença em incidência, por motivos que incluem um estilo de vida sedentário, obesidade, hábitos alimentares inadequados e fatores genéticos, requer cuidados e atenção redobrada para minimizar seus efeitos danosos e oferecer uma qualidade de vida satisfatória para essa população (Moreira, 2013).

De acordo com o MS, o DM é um dos mais crescentes exemplos de doenças crônicas não transmissíveis, considerado o principal responsável pelas mortes e hospitalizações no Brasil (Souza, 2013). Caracterizam-se por terem etiologia multifatorial e difícil controle, o que implica na necessidade de orientações voltadas para vários objetivos, necessitando, dessa forma, um tratamento mais efetivo com a interação de vários profissionais de saúde (Costa; Castro, 2013).

A diabetes mellitus é uma alteração complexa que afeta o metabolismo de carboidratos, proteínas e lípidos, caracterizada por uma hiperglicemia crônica que resulta da falha de secreção da insulina ou da sua ação. A ingestão dos alimentos por indivíduos diabéticos deve ser feita de forma controlada, preferencialmente por alimentos com baixo índice glicêmico (Krinski, 2006).

O DM tipo 1 representa cerca de 5% a 10% do total de casos e é caracterizado pela destruição das células β do pâncreas, responsáveis por secretar insulina. Este tipo subdivide-se em tipo 1A, onde a destruição das células β é autoimune, tipo 1B, considerado idiopático e, por fim, o *Latent Autoimmune Diabetes of the Adult* (LADA)

no qual a causa da destruição de células β também é autoimune, porém acomete adultos acima dos 30 anos que apresentam progressiva perda funcional das células β , passando do tratamento com hipoglicemiantes orais para insulina. Os outros mais de 90% dos casos possuem o diagnóstico do DM tipo 2, o qual expressa-se predominantemente em indivíduos acima de 30 anos, sem caráter autoimune, caracteriza-se por defeitos na secreção e ação da insulina e sua patogênese envolve aspectos genéticos e ambientais (Souza, 2013).

O aparecimento da DM1 é mais comum na infância e na adolescência e a DM 2 é mais comum na vida adulta (embora já observado em crianças) e se deve à utilização ineficaz da insulina, estando também relacionada ao estilo de vida sedentário, à alimentação inadequada e à obesidade (Moreira, 2013).

A DM é uma doença crônica e seu tratamento requer um controle difícil de ser atingido, havendo a necessidade de o portador participar ativamente desse processo. Os processos metabólicos que acontecem automaticamente nas pessoas sem a doença devem ser regulados pelos pacientes através de seus comportamentos. No tratamento do diabetes, a pessoa enfrenta vários desafios comportamentais. O tratamento envolve numerosas tarefas diárias e mudanças nos hábitos de vida, tais como seguir uma dieta alimentar e realizar exercícios por toda a vida (Malerbi, 2005).

A HAS é uma condição multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial sistêmica, é considerada um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (Castro; Moncau; Marcopito, 2007). Pode ocasionar o comprometimento de órgãos alvos, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, com frequência está associada a alterações funcionais e estruturais desses órgãos e a alterações metabólicas (Daudt, 2013).

A predisposição genética vem sendo alvo determinante na compreensão desta síndrome. Os fatores genéticos são responsáveis por uma grande parcela de casos referentes a distúrbios na pressão hemodinâmica. Isto fica evidente devido à incidência maior de hipertensão em famílias de hipertensos, pois a tendência hereditária costuma aparecer em cerca de 75% de todos os pacientes. Já em 95% dos casos não há uma causa subjacente chamada de hipertensão idiopática, as vezes referida como hipertensão essencial pode ser resultante de fatores genéticos, de uma dieta com altas taxas de sódio, do estresse psicológico, da obesidade, da inatividade física (sedentarismo). Alguns fatores responsáveis no desenvolvimento da hipertensão podem ser decorrentes de problemas renais, ou com pequenas glândulas

chamadas adrenais. Determinando a esta condição como hipertensão secundária (Krinski, 2006).

Atualmente o conceito que melhor define hipertensão é o que estabelece uma situação clínica multifatorial e reconhecida como síndrome por relacionar os níveis tensionais elevados a alterações metabólicas, hormonais e por associação fenômenos trágicos como hipertrofia cardíaca e vascular (Krinski, 2006).

A HAS é uma doença prevalente, com alta morbi-mortalidade em todo o mundo, mas com controle clínico bem-sucedido na maioria dos casos, desde que seja feito diagnóstico precoce e adesão do doente ao tratamento proposto. É uma doença multifatorial, apresentando relação com fatores genéticos e ambientais, porém a fisiopatologia não está totalmente elucidada (Cavallari et al., 2002).

Mesmo sendo assintomática, a HAS é responsável por complicações cardiovasculares, encefálicas, coronarianas, renais e vasculares periféricas. E parcela importante da população adulta com hipertensão não sabe que é hipertensa; e muitos dos que sabem não estão sendo adequadamente tratados. Estima-se que 40% dos acidentes vasculares encefálicos e em torno de 25% dos infartos ocorridos em pacientes hipertensos poderiam ser prevenidos se lhes fosse imposto terapia anti-hipertensiva adequada (Toscano, 2004).

As complicações da HAS, em muitos casos, levam o paciente a requerer cuidados médicos de alto custo, exigindo uso constante de medicamentos, exames complementares periódicos e procedimentos como diálise e transplante. No Brasil, as doenças cardiocirculatórias são uma das principais causas de internações hospitalares e reconhecidamente envolvem custos elevados (Cavallari et al., 2002).

A hipertensão é muito frequente em pacientes obesos diabéticos tipo 2. Em contraste com a hipertensão no diabetes tipo 1, em pacientes com diabetes tipo 2, a hipertensão se desenvolve mesmo na ausência de lesão renal. O risco de diabetes tipo 2 e hipertensão está fortemente relacionado à obesidade e à distribuição central da gordura corporal. O conjunto de anormalidades que inclui obesidade, hipertensão, diabetes tipo 2 e dislipemia é denominado síndrome metabólica. A resistência à insulina com hiperinsulinemia é característica da síndrome metabólica, e esta condição tem sido associada a alto risco cardiovascular, morbidade e mortalidade. A hiperinsulinemia pode levar a hipertensão e a alterações no perfil lipídico, predispondo a aterosclerose vascular. A elevação da insulina plasmática poderia elevar a pressão arterial por diversos mecanismos, incluindo ativação do sistema nervoso simpático e

retenção de sódio. Alterações na medula renal, resultando em ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, poderia também contribuir para a retenção de sódio e conseqüentemente a hipertensão nos indivíduos predispostos (Faria et al., 2002).

A ocorrência de HAS e DM multiplicam os fatores de risco para doença micro e macrovascular, resultando em aumento do risco para mortalidade cardiovascular, doença coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, doença cerebrovascular e doença vascular periférica. Complicações macrovasculares contribuem para a maioria das mortes em pacientes diabéticos, e a ausência de hipertensão está associada com aumento da sobrevida (Faria et al., 2002).

O tratamento em HAS se faz necessário, cujo objetivo é prevenir as sequelas de longa evolução da doença fazendo com que os níveis pressóricos estejam o máximo possível próximo do ideal. Uma forma de se manter níveis ideais da pressão arterial sérica é alcançada através de uma dieta balanceada e um programa de atividade física, se tornando imprescindíveis na melhora da patologia. Um estilo de vida causado na pratica regular de atividade física, promove benefícios para a saúde e conseqüentemente para a qualidade de vida de indivíduos normotensos e hipertensos (Krinski, 2006). Embora se trate de uma doença crônico-degenerativa de fácil diagnostico e com grande diversidade terapêutica, seu controle constitui um desafio aos pacientes em virtude das mudanças de estilo de vida necessárias. A não adesão ao tratamento tem atingido aproximadamente 50% dos pacientes e envolve aspectos biológicos, psicológicos, culturais e sociais. Este fato tem contribuído para onerar os custos do Sistema de Saúde. No Brasil, ocorreram cerca de 150.000 internações por doenças cardiovasculares, com custo global de 475 milhões de reais (Moura et al., 2011).

Os fluidos corporais contêm informações físicas vitais que são frequentemente utilizadas para diagnóstico clínico. A urina é um importante fluido corporal e uma amostra pode ser coletada de maneira rápida e não invasiva. O exame de urina fornece informações sobre o metabolismo corporal e o estado da função renal. As amostras de urina podem ser facilmente adquiridas, fornecendo informações importantes para o diagnóstico de diversas doenças metabólicas (McMurdy, 2003).

A creatinina é um dos principais biomarcadores analisados na urina, e é um produto do metabolismo muscular. É filtrada nos glomérulos, e a quantidade secretada não é constante e depende do indivíduo e da concentração plasmática do analito, dificultando a determinação de uma constante de exceção, que depende

principalmente da massa muscular. Para avaliar a taxa de filtração glomerular, o clearance de creatinina continua sendo um marcador mais utilizado na avaliação de função renal, o qual avalia a velocidade e a eficácia da filtração glomerular através da análise de urina coletada durante um período de 24 h, fato este que caracteriza a dificuldade na realização do teste. Com objetivo de evitar a coleta da urina de 24 h, algumas fórmulas foram criadas para facilitar a análise da filtração glomerular, um exemplo de fórmula é a equação de Cockcroft-Gault, derivada de relações empíricas e que foi validada em numerosos indivíduos. Na equação é necessário o conhecimento de variáveis como idade, peso, creatinina basal e sexo do paciente. Os valores de referência para adultos saudáveis são acima de 90 mL/min (Sodré, 2007). É comumente utilizado para o teste que mede a função de filtração renal; sua avaliação também tem valor na representação de comprometimento renal (Wang et al., 2005).

Conforme Berg et al. (1997) a ureia é um dos principais metabólitos contendo nitrogênio nos sistemas biológicos. Em humanos, a síntese de ureia é a principal via de remoção do nitrogênio residual gerado pelo metabolismo de proteínas e aminoácidos. Esse processo ocorre no fígado por meio do ciclo da ureia. A ureia é então removida do sangue e excretada na urina pelos rins. Tanto a produção quanto a regulação da ureia estão intimamente relacionadas a vários processos metabólicos (Ignarro et al., 2001). É sintetizada no fígado a partir do dióxido de carbono e amônia, circulante no sangue e filtrado nos rins, devido a metabolização das proteínas, tendo a ureia como principal produto, sendo assim excretado a maior parte pela urina. Além de ser um dos indicadores de problemas renais, não é tão específico quanto a creatinina, mas por ser mais sensível a alterações primárias das condições renais é um marcador crucial dessas alterações que ocasionam patologias. A dosagem da ureia na urina vem sendo amplamente utilizada no campo da nutrição, principalmente, em condições de baixa ingestão de proteínas ou privação alimentar (Ramos, Marini, 2014).

Para Montero et al. (2016) a proteinúria é uma das manifestações clínicas mais comuns da nefropatia diabética e se correlaciona intimamente com a transdiferenciação de células mesenquimais, e apesar da membrana basal ser uma barreira muito eficaz contra moléculas grandes, uma pequena quantidade de proteínas que atravessar pelos capilares da membrana basal, para o filtrado

glomerular, pode agravar o quadro da nefropatia diabética, evoluindo para a doença renal terminal.

A glicosúria pode ser medida através de fitas reagentes que fazem uma medida semiquantitativa da glicose na urina e é de fácil realização e de baixo custo e o resultado se torna positiva quando a sua concentração sérica é superior a 180 mg/dL em pacientes com função renal normal e com valores ainda mais elevados em pacientes com nefropatia diabética (Gross et al., 2002).

O fosfato é um ânion intracelular mais abundante no corpo e é um componente importante em múltiplos processos fisiológicos que afetam muitos sistemas de órgãos diferentes (Peppers et al., 1991). Níveis elevados de fosfato sérico são geralmente encontrados em pacientes com DRC moderada a grave, e estão associados à calcificação valvular e vascular cardíaca, levando ao aumento de eventos cardiovasculares e mortalidade (Foley, 2009). Em uma pesquisa desenvolvida por (Kawasaki, 2015), há evidências de que os níveis séricos mais altos de fósforo depende da ingestão de proteínas e é um fator de risco para doença cardiovascular em pacientes com doença renal crônica. O estudo mostrou que a maior excreção de fósforo por depuração de creatinina foi associada à progressão da doença renal crônica. Essa associação permaneceu após o ajustes para outros possíveis fatores de riscos relacionados à progressão da DRC.

No estudo desenvolvido por Bispo e colaboradores foi empregado o modelo PCA seguida de análise discriminante, onde foi possível revelar análise espectral de ureia. Os resultados sugeriram que a técnica foi sensível para diferenciação dos biomarcadores dos grupos de estudo em questão (Bispo et al., 2013). Este soluto é o mais importante catabólico do metabolismo proteico, este, sendo que sua retenção em disfunções renais (uremia) representa um sinal de retenção de outras substâncias, que também prejudicam o organismo quando em excesso (AIRES, 1999).

Em um estudo desenvolvido por Heathcote (2009), concluiu-se que o exercício físico pode modificar a depuração renal e conseqüentemente alterar a concentração dos metabólitos na urina. No trabalho feito por Schwingshackl e Hoffmann (2014), foi evidenciado que as dietas com alto teor de proteína foram associadas ao aumento da TFG, ureia sérica, excreção urinária de cálcio e concentrações séricas de ácido úrico.

2.1.8 – Automação em Urinálise

A urina é um fluido biológico altamente importante para pesquisa de biomarcadores, pois pode ser coletada por técnicas não invasivas e relativamente em grandes volumes. Ela contém elementos celulares, bioquímicos e proteínas derivados da filtração glomerular do plasma, excreção dos túbulos renais e secreções do trato urogenital que refletem, em um determinado momento, o estado metabólico e fisiopatológico de um indivíduo (Harlope et al., 2016). O exame parcial de urina representa um dos exames mais solicitados na rotina dos laboratórios de análises clínicas. Essa alta demanda nos laboratórios atuais se deve ao fato da análise da urina ser capaz de fornecer, de forma simples e rápida, informações importantes sobre o funcionamento dos rins e do trato urinário (Bottini, 2006).

Na avaliação da urina tipo I, são incluídos suas características físicas (cor, clareza e volume), parâmetros bioquímicos (pH da urina, sangue, glicose, cetonas, bilirrubina, urobilinogênio e proteína) e avaliação microscópica de sedimentos (hemácias, leucócitos, organismos, células epiteliais, cristais e elencos) (Reine; Langston, 2005). O parcial de urina é um exame realizado de forma manual em grande parte dos laboratórios e há décadas, a análise microscópica do sedimento urinário é considerada padrão ouro na urinálise. No entanto, a introdução de novas tecnologias tem aumentado a exatidão e a produtividade desse procedimento (Delanghe, 2014).

Um diagnóstico eficaz, que garanta a qualidade do serviço e o torna válido depende de padronização em todas as etapas do exame, que incluem coleta, transporte e a análise (Chaves, 2010). A escolha do método a ser empregado na análise da urina deve proporcionar a identificação e quantificação correta dos constituintes urinários (European Urinalysis Group, 2000).

O exame de urina tipo I também serve para monitorar o progresso de doenças, a eficácia terapêutica e a triagem de trabalhadores assintomáticos para doenças adquiridas em indústrias e faz parte dos exames em Saúde ocupacional, como triagem admissional ou demissional (Oliveira e Mendes, 2011; Vale e Miranda, 2012, Henneberg, 2015).

A automação, que surge como inovação metodológica para urinálise, tem demonstrado resultados confiáveis na análise quantitativa dos elementos presentes

na urina e têm reduzido o tempo para a execução do exame (Henneberg, 2014). Vem sendo utilizada na rotina dos grandes laboratórios de análises clínicas como uma ferramenta útil, que fornece resultados com rapidez e segurança, melhorando a rotina por dispensar preparação prévia da amostra. O método manual é menos preciso devido ao baixo número de células contadas e por ser dependente do observador, porém, a automação é incapaz de identificar corretamente todos os elementos presentes na urina (Henneberg, 2014).

Em um estudo desenvolvido por Henneberg et al. (2015) verificou-se foi possível diferenciar a população de células, porém o equipamento não classifica o dimorfismo eritrocitário, o que demonstra a importância de manter associada à microscopia. Para outros elementos como cilindros hialinos, o resultado da automação foi confirmado pela microscopia. Porém, em estudo realizado por Bottini (2006), mostrou que a contagem de cilindros pela automação sofreu influência dos filamentos de muco e também ao pequeno número de elementos na amostra.

No trabalho de Henneberg (2014) evidenciou-se que a automação está sujeita aos mesmos erros de centrifugação que o método manual e que a diferenciação de eritrócitos isomórficos e dismórficos, cristais e elementos raros, continuam dependentes da microscopia. A automação pode apresentar uma perda ou dano na contagem quando se trata de pequenas células ou pequenos eritrócitos. Uma estratégia racional seria a combinação da análise automática e a visual, com as medições químicas e bacteriológicas como uma inovação para o exame de urina (*European Eurinalysis Group*, 2000). Assim, o uso do equipamento é uma alternativa para a análise microscópica podendo ser automatizado ou semi-automatizado, aumentando a reprodutibilidade dos resultados, mas todas as técnicas e protocolos utilizados na automação devem estar padronizados e atender as normas do CQ Laboratorial. Os fabricantes de analisadores em urinálise devem descrever em detalhes a capacidade de diferenciação do respectivo instrumento, incluindo a sensibilidade e dados da especificidade em relação aos métodos manuais. Uma listagem de possíveis interferentes conhecidos deve estar disponível para a avaliação do resultado e da prática clínica. A automação melhora muito a precisão, pois efetua uma contagem de um número muito maior de células do que o método visual. A automação também pode auxiliar na validação de outros métodos (*European Urinalysis Group*, 2000; Henneberg et al; 2015).

A automação minimiza problemas enfrentados no método manual, onde se pode citar a subjetividade devido à interpretação de cada observador e o menor volume urinário necessário para análise. Também reduz o tempo de execução do exame, facilita o controle dos dados por permitir o arquivamento de um determinado número de amostras. O objetivo da automação é melhorar a reprodutibilidade e produtividade do exame de urina, favorecendo a padronização das etapas e garantindo um relato consistente dos dados (Strasinger, 2008).

2.2 Espectroscopia Raman: Fundamentação técnica e análise em fluídos biológicos com ênfase na urina

A espectroscopia Raman é definida como estudo do espectro obtido pela interação da radiação eletromagnética com a matéria. Sendo um dos seus principais objetivos, a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Esta técnica de análise utiliza a radiação eletromagnética para avaliar o comportamento vibracional das moléculas, observando-se a absorção ou espalhamento dessa radiação. A aplicação da técnica vem sendo utilizada com sucesso no diagnóstico de doenças a partir da análise de materiais biológicos, permitindo a caracterização bioquímica da amostra. O espectro Raman proporciona informação química e estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, permitindo assim sua identificação em poucos segundos, com pouca ou sem a necessidade de preparação da amostra (Shapiro et al., 2011).

A ER pode ser considerada como complementar a espectroscopia de absorção, porque nenhuma técnica sozinha pode resolver todos os estados da energia de uma molécula. De fato, para determinadas moléculas, alguns níveis de energia não podem ser resolvidos isoladamente por uma ou outra técnica (Hanlon et al., 2000).

O efeito Raman que ocorre na ER é fundamentado basicamente na troca de energia entre a luz (radiação eletromagnética) incidente e a matéria incidida. Quando uma molécula é irradiada por uma radiação eletromagnética, esta radiação pode ser absorvida ou espalhada. Na ER o que é estudado é a radiação que foi espalhada pela matéria. O fenômeno óptico de espalhamento da luz ocorre quando um feixe de luz

atinge um obstáculo e é disperso devido à colisão com partículas menores (Ball, 2001).

Os métodos espectroscópicos para análise de urina oferecem várias vantagens sobre métodos químicos, incluindo o contato, menos amostra e maior quantidade de informações, sendo que a urina tem sido objeto de vários estudos espectroscópicos. Um exame de urina fornece informações de diagnóstico sobre doenças metabólicas, alterações de biomarcadores renais, infecções do trato urinário e outras doenças. Além de problemas médicos, o teste do abuso de substância pela urina é comum, especialmente nas forças armadas, prisões, onde os testes de rotina são obrigatórios (McMurdy et al., 2003).

A ER é um sistema que permite a análise da urina e pode ser desenvolvida para detectar componentes simples ou múltiplos. Não envolve etapas químicas adicionais para análise (separação, diluição ou mistura de quaisquer outros reagentes), podendo mostrar-se superior aos atuais métodos de teste (Premasiri; Clarke; Womble, 2001).

A técnica de ER apresenta inúmeras vantagens, por isso vem sendo aplicada em diversas áreas biomédicas, onde o material biológico pode ser analisado em um curto espaço de tempo, onde a coleta do sinal Raman é bastante rápida, e pode-se analisar amostras líquidas ou sólidas em tempo real). A espectroscopia Raman tem um grande potencial para fornecer informação de diagnóstico quantitativo *in vivo*. A principal vantagem da ER em aplicações biomédicas é a de que, por meio do ajuste da frequência de excitação, próximo da absorção de frequência, os marcadores bioquímicos da doença podem ser seletivamente observados no espectro de Raman (Guimarães et al., 2006).

Em urinálise, em particular, o primeiro uso da ER para medir as concentrações de creatinina em amostras de urina sem alterações, de pacientes saudáveis, em níveis clínicos foi relatado por (McMurdy e Berger, 2003), os quais utilizaram excitação no infravermelho próximo (785 nm) para obter espectros Raman.

Wang et al., 2010 utilizaram o *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS) aplicado em um novo tipo de substrato para detectar níveis de creatinina na urina de pacientes diabéticos, visando a detecção precoce de doenças renais.

Bispo et al. (2013) identificaram biomarcadores (ureia, creatinina e glicose) na urina de pacientes diabéticos e hipertensos, através da PCA juntamente com um modelo discriminante baseado em regressão logística, referindo-se como a

possibilidade de diagnóstico de possíveis complicações decorrentes destas doenças através da ER. Utilizando o mesmo tipo de análise via PCA, a ER também foi eficaz na detecção de antibióticos na urina (Kumar, 2013) e outros metabólitos como biomarcadores da nicotina e cotinina para identificação de exposição ao tabaco, ativos ou passivos (Huang, 2013), bem como ácido úrico como indicativo de pré-eclâmpsia em gestantes (Goodall, 2013).

Estes e outros avanços técnicos fazem a ER ser definida como uma ferramenta muito promissora para a análise rápida, não-invasiva e de baixo custo de multi-parâmetros em sistemas biológicos. Tem-se considerado, por muito tempo, a potencialidade de aplicação da ER para análise quantitativa de vários compostos. A ER caminha para no futuro próximo se tornar uma prática rotineira como uma técnica quantitativa em análises clínicas (Lombardi et al., 1994).

2.3 Quantificação, discriminação e classificação através de ferramentas estatísticas

2.3.1 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares - PLS*)

O método dos mínimos quadrados parciais é uma técnica de regressão para resolver múltiplas variáveis independentes e múltiplas variáveis dependentes. Comparado com a análise de regressão tradicional, o PLS supera os problemas de multicolinearidade, tamanho de amostra pequeno e limite de número variável (Tsuchida, 2017).

Devido à natureza multivariada dos dados obtidos pela espectroscopia Raman, os mesmos se beneficiam de métodos estatísticos multivariados como a técnica de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares - PLS*) favorecendo uma avaliação quantitativa desses dados (Enejder, 2002), correlacionando várias informações do espectro com as mudanças na concentração dos elementos bioquímicos da amostra, permitindo analisar dados mesmo quando da presença de interferentes. Esses métodos consideram todas as informações espectrais relevantes e desprezando as informações não correlacionadas com a concentração de analitos de interesse, mantendo-se inalterados mesmo com inclusões de novas amostras (Berger, 1997).

No modelo de regressão PLS, todas as variáveis espectrais são incluídas para estimar a concentração do analito, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes (ruído, por exemplo), não havendo necessidade do conhecimento prévio da natureza e número dos mesmos. O modelo PLS determina quais variáveis latentes possuem maior correlação com as variações presentes nas amostras, permitindo a quantificação de analitos de interesse (Bispo et al., 2013).

A base fundamental do método PLS é a determinação da matriz de covariância dos dados, consistindo na manipulação da matriz de dados buscando a maximização da covariância entre os fatores e, com isto, evidenciando as variações presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados variáveis latentes ou autovetores) representando as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (Everall et al., 1996).

O PLS usa a informação das concentrações, presente em cada espectro, na obtenção das variáveis latentes, ou seja, busca a covariância entre as variáveis independente e dependente. As primeiras variáveis latentes descrevem a direção de máxima variância, que também se correlacionam com a concentração. Os métodos multivariados são robustos, pois seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração. Desta forma, este método tem se tornado uma ferramenta extremamente útil em muitos campos da química e engenharia (Everall, 1996).

O desenvolvimento de um modelo baseado na técnica de análise multivariada de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais permite utilizar toda a informação espectral disponível, melhorando a previsão, já que variações podem ocorrer não somente no pico, mas também em larguras de banda, por exemplo. A confiabilidade do modelo PLS é dependente do número de amostras utilizadas na construção do modelo, de forma que se possam prever concentrações desconhecidas em um grande número de amostras. Mas para isto faz-se necessário um número alto de situações experimentais, o que, às vezes, torna-se inviável na prática.

Variações como potência da fonte de luz, tipo de amostra, alinhamento do equipamento e posição da amostra também são fatores que interferem na eficiência do modelo, causando alterações espectrais. Porém, se as variáveis relevantes são

consideradas no modelo multivariado, o procedimento de calibração é eficiente e preciso, mesmo com poucas características espectrais (Everall, 1996).

Técnicas de espectroscopia têm sido utilizadas para análise de tecidos biológicos, apresentando resultados bastante confiáveis, uma vez que se consiga adequar a técnica espectroscópica às informações necessárias para uma análise precisa da amostra. Quando a luz incide sobre uma substância qualquer, ela pode ser absorvida ou espalhada elasticamente. A espectroscopia de infravermelho (IR) mede a frequência na qual uma dada amostra absorve uma radiação IR e a intensidade desta absorção. Assim, o espectro de infravermelho representa a identificação de uma amostra com picos de absorção correspondentes à frequência de vibração entre os átomos constituintes do material. A determinação das frequências permite identificar os componentes químicos da amostra, visto que cada grupo químico é conhecido por absorver luz em uma dada frequência. A intensidade de uma absorção está relacionada com a concentração de um respectivo componente, fornecendo, assim, uma análise quantitativa (Silveira, 2001).

2.3.2 Análise dos Componentes Principais (*Principal Component Analysis - PCA*)

A base fundamental do método de regressão PLS é a Análise dos Componentes Principais (*Principal Component Analysis - PCA*), que consiste em uma manipulação da matriz de dados visando representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de fatores. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (Ito, 2013). Este enfoque matemático é capaz de transformar linearmente um espaço m -dimensional em um espaço d -dimensional (onde $d < m$) baseada na covariância dos dados. Desta forma, as coordenadas destes dados (agora em um novo espaço) não estão correlacionadas, e com o uso de algumas variáveis, ou componentes principais, preserva-se a maior quantidade de variância dos dados originais. Seu procedimento matemático baseia-se na obtenção do padrão de variabilidade característico dos espectros de determinado material, fundamentado na repetição do experimento com diferentes

amostras deste material sob diferentes condições (no caso, normal e dialítico). As diferenças entre os grupos (se existirem) aparecem nas primeiras variáveis ou componentes principais (Chatfield, 1980).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, com abordagem quantitativa e qualitativa. A abordagem de pesquisa quantitativa é uma classificação de método científico que utiliza diferentes técnicas estatísticas para quantificar opiniões e informações para um determinado estudo. A pesquisa qualitativa é um método de investigação científica que se foca no caráter subjetivo do objeto analisado, corresponde a profundidade de significados, estudando as suas particularidades e experiências individuais (MINAYO, 2010)

3.2 Obtenção das amostras de urina e análise quimiométrica bioquímica

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi (parecer N^o. 2.717.746 – C.A.A.E. 91318518.9.0000.5492 – Anexo A), de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos (resolução N^o. 466/2012). Um total de 40 pacientes (24 mulheres e 16 homens; Idade: 50,12 ± 16,23 anos) foram recrutados e alocados da seguinte forma: 20 voluntários saudáveis (normoglicêmicos e normotensos) em um Grupo Controle (CT), e 20 indivíduos em um Grupo de Diabéticos e Hipertensos (DM & HAS), que não apresentavam lesão renal. Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). A Ficha de Anamnese (Apêndice B) foi coletada a fim de obtenção dos dados clínicos. As amostras de urina foram coletadas em frasco estéril, onde os voluntários foram orientados a coletar o jato médio na micção espontânea, após a higienização prévia externa da genitália, ou seja, o primeiro jato deveria ser descartado e o jato médio seguinte depositado no frasco de coleta.

As amostras biológicas foram obtidas pela manhã, com os indivíduos em jejum, e foram acondicionadas em tubos criogênicos de 2 mL e congeladas em freezer a -80°C até a análise laboratorial e espectral. As amostras dos voluntários normoglicêmicos e normotensos dos grupos CT e DM & HAS foram obtidas em uma unidade de saúde da Secretaria Municipal de Saúde do município de Santarém-PA,

Brasil. Os critérios de inclusão e exclusão foram os mesmos para ambos os grupos. Critério de inclusão: foram incluídos sujeitos com TFG dentro dos valores de referência para idade e sexo. Critérios de exclusão: foram excluídos os indivíduos que apresentassem sintomas ou manifestações clínicas de infecção urinária, que não estivessem em jejum antes da coleta e que relatassem sintomas de instabilidade cardiovascular como angina, palpitações e descompensação hemodinâmica.

Após a coleta, as amostras de urina foram submetidas à análise quimiométrica bioquímica por meio de um equipamento espectrofotométrico analítico automatizado (modelo Atellica CH 930 Analyzer, Siemens Healthcare Diagnósticos S.A., São Paulo, SP, Brasil, Tabela 1), e os valores de ureia, creatinina, glicose, e fosfato foram obtidos com kits específicos (Atellica – ref. 11097593 para ureia, ref. 11097533 para creatinina, ref. 11097592 para glicose e ref. 11097611 para fosfato). A dosagem da proteína total foi realizada com um kit comercial (modelo Sensiprot, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) e a absorbância da reação final foi considerada em 600 nm. A Tabela 2 apresenta a rotina de calibração para as curvas padrão do ensaio de espectrofotometria e a linearidade das curvas. Os experimentos de espectrofotometria foram conduzidos a uma temperatura de 20°C (\pm 1°C), e umidade relativa de 60% (\pm 10%), enquanto os experimentos Raman foram conduzidos a uma temperatura de 22°C (\pm 1°C), e umidade relativa de 60% (\pm 10%).

Tabela 1. Principais especificações técnicas e detalhes do equipamento espectrofotométrico automatizado utilizado (Atellica CH 930 Analyzer).

Principais especificações técnicas	Detalhes
Descrição Geral	Analisador químico com recursos de teste eletrolítico (IMT) e fotométrico
Volume de amostra por teste	Fotométrico: 0,4 μ L a 5,0 μ L (varia de acordo com o ensaio) IMT: 25 μ L produz resultados para sódio (Na ⁺), potássio (K ⁺) e cloreto (Cl ⁻)
Fotômetro de detecção de reação	11 comprimentos de onda fixos (340, 410, 451, 478, 505, 545, 571, 596, 658, 694 e 805 nm)
Gerenciamento de estoque de reagentes	Rastreamento automático e notificação de testes restantes, estabilidade e validade a bordo, calibração e condições de armazenamento para cada pacote e poço
Volume médio de reagente	10–100 μ L por teste, dependente do ensaio

Calibração automática	Calibração automática de lote e embalagem específica do ensaio (quando conectado ao manipulador de amostras Atellica)
-----------------------	---

Mais especificações técnicas estão disponíveis no site do fabricante (Siemens Healthcare GmbH), disponível em: https://www.siemens-healthineers.com/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers#TECHNICAL_DETAILS

Tabela 2. Limite de detecção do analito (LOD) e linearidade dos ensaios químicos na urina de acordo com o fabricante do kit comercial

Analito	Limite de Detecção (LOD)	Linearidade
Glicose	2 mg/dL (0.1 mmol/L)	4–700 mg/dL (0.22–38.85 mmol/L)
Fosfato	0.5 mg/dL (0.16 mmol/L)	4.0–100.0 mg/dL (1.29–32.30 mmol/L)
Creatinina	0.02 mg/dL (2 µmol/L)	1.00–245.00 mg/dL (88–21658 µmol/L)
Ureia	4 mg/dL (1.4 mmol/L)	35–1000 mg/dL (12.5–357.0 mmol/L)
Proteína total	0.12 mg/dL (0.0012g/L)	100 mg/dL (5.6 mmol/L)

O cálculo da concentração foi realizado a partir de uma curva padrão, levando em consideração a linearidade de cada analito presente na urina (Tabela 2). Para calibração dos ensaios químicos (glicose, fosfato, creatinina e ureia) pela espectrofotometria foi utilizado para calibração.

O cálculo da concentração foi realizado a partir de uma curva padrão, levando em consideração a linearidade de cada analito presente na urina, conforme descrito a seguir. Para calibração dos ensaios químicos (glicose, fosfato, creatinina e ureia) foi utilizada a espectrofotometria para calibração. A linearidade para os ensaios de glicose, fosfato, creatinina e ureia empregados foram, respectivamente, 4–700 mg/dL (0,22–38,85 mmol/L); 4,0–100,0 mg/dL (1,29–32,30 mmol/L); 1,00–245,00 mg/dL (88–21658 µmol/L); 35–1000 mg/dL (12,5–357,0 mmol/L). A linearidade para a proteína total foi até 100 mg/dL (5,6 mmol/L). O limite de detecção (LOD) dos ensaios de glicose, fosfato, creatinina, ureia e proteína total foram, respectivamente, 2 mg/dL (0,1 mmol/L); 0,5 mg/dL (0,16 mmol/L); 0,02 mg/dL (2 µmol/L); 4 mg/dL (1,4 mmol/L) e 0,12 mg/dL (0,0012 g/L).

De acordo com as instruções presentes nos kits dos equipamentos do espectrofotômetro analítico, alguns componentes podem interferir na análise bioquímica, dependendo de cada composto ensaiado. As substâncias interferentes

(hemoglobina, bilirrubina conjugada, bilirrubina não conjugada e lipemia) foram testadas de acordo com a diretriz EP07-A2 (CLSI, 2005), e diretrizes específicas do fabricante do kit (Atellica™). De acordo com as substâncias interferentes mencionadas, aceitamos interferência $\leq 10\%$.

3.3 Coleta dos espectros

A coleta de espectros foi realizada em um espectrômetro Raman dispersivo (modelo Di-mension P-1, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA). O equipamento utiliza um laser de diodo multimodo de 830 nm com potência de saída de cerca de 400 mW. Um cabo de fibra óptica (sonda Raman) (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc.) foi usado para fornecer radiação à amostra e coletar o sinal; o uso de uma sonda Raman permite geometria repetível de excitação e coleta de sinal. A potência do laser medida na ponta da sonda foi de 350 mW com uma cintura de feixe de cerca de 170 μm . Os experimentos Raman foram conduzidos a uma temperatura de 23°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 60% ($\pm 10\%$). As amostras de urina foram colocadas em um porta-amostras de alumínio com orifícios de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 80 μL de volume. A sonda Raman foi colocada a 10 mm do porta-amostras. O sinal Raman foi coletado com um tempo de integração de 5 s. Seis espectros foram coletados aleatoriamente de cada amostra, totalizando 240 espectros para as 40 amostras ($n = 20$ para cada grupo), e um total de 8 espectros foram excluídos devido à baixa relação sinal-ruído ($\text{SNR} < 10$). A Figura 1 mostra o número de amostras elegíveis e o número de espectros utilizados no estudo.

Os espectros Raman foram então pré-processados na seguinte ordem: remoção manual de picos de raios cósmicos, remoção automática do sinal de linha de base de fluorescência ajustando e subtraindo um polinômio de quinta ordem e normalização automática pela área da banda de água em 1660 cm^{-1} . Este pré-processamento foi realizado em rotina laboratorial utilizando o software Matlab (versão 7.4.0, The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA). Os espectros Raman médios normalizados da urina dos grupos estudados foram plotados e comparados.

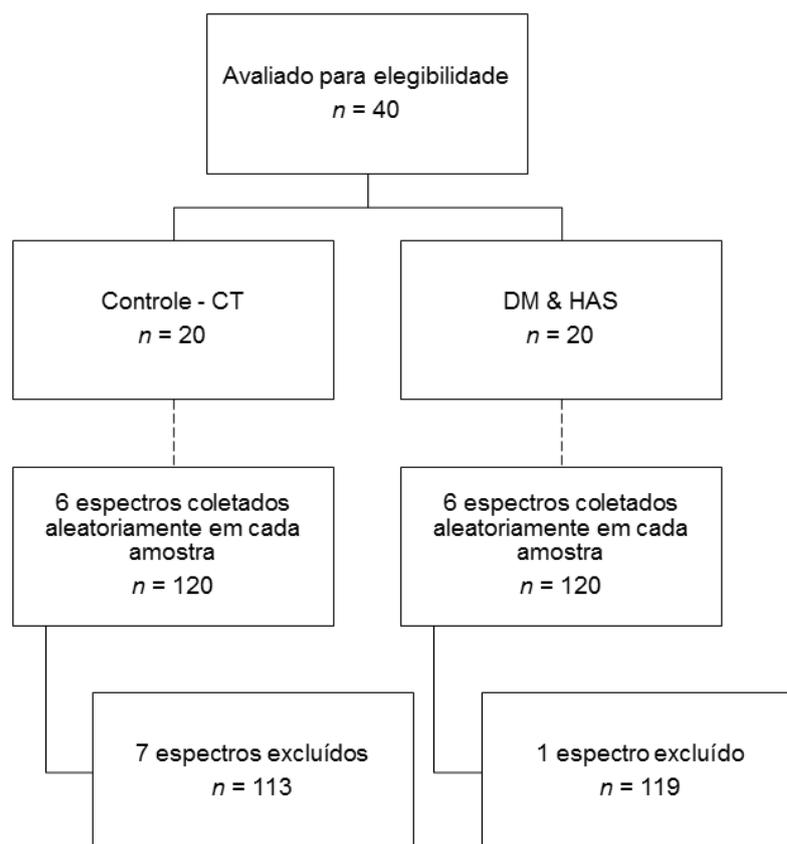


Figura 1 Diagrama ilustrativo para demonstrar o número de elegibilidade da amostra avaliada, e os espectros totais incluídos e excluídos do estudo.

3.4 Análise de dados: Modelos de regressão linear para análise quantitativa e discriminação

Os espectros médios normalizados de urina dos grupos estudados foram plotados e comparados, a análise estatística foi realizada a partir do teste *t* de Student ($p < 0,05$, software GraphPad InStat, v. 3.0, InStat, EUA). Um modelo espectral baseado na técnica multivariada PLS foi aplicado aos espectros Raman de urina para quantificar as concentrações de uréia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total usando os resultados do método colorimétrico como entrada, e para discriminá-los (PLS- DA) usando o critério de classificação (PLS) obtido entre os grupos CT e DM & HAS, juntamente com os valores das duas técnicas analíticas (espectrofotometria e espectroscopia Raman), como mostra a Figura 2.

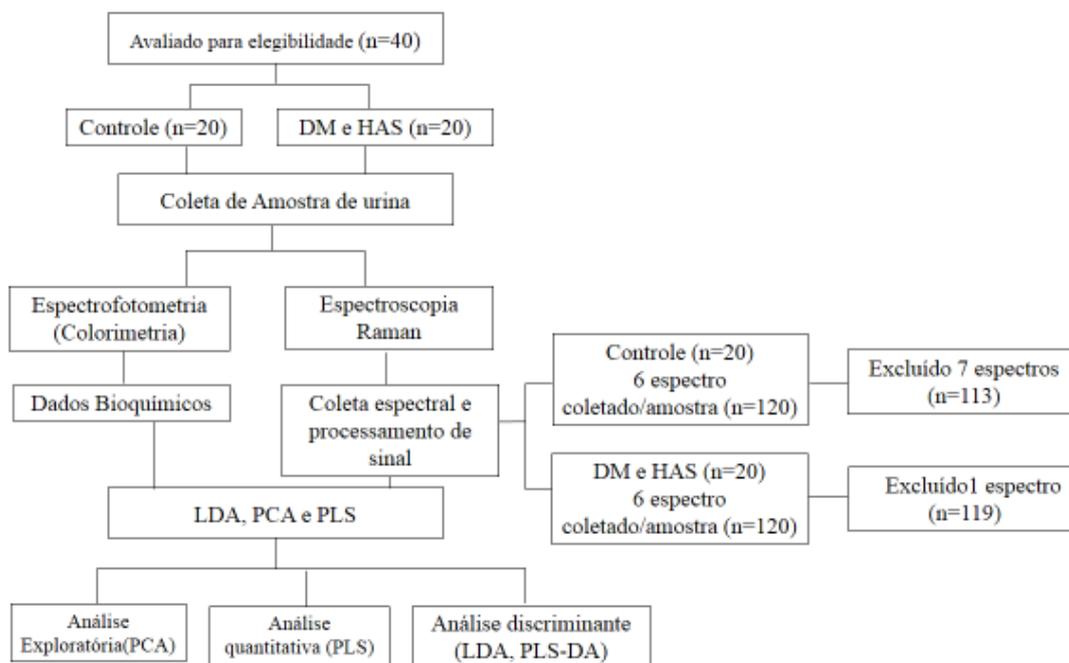


Figura 2 Diagrama dos dados de configuração experimental.

3.5 Processamento e análise de dados: análise exploratória e modelos de regressão linear para quantificação e discriminação

A Figura 2 também mostra o diagrama dos dados de configuração experimental. A PCA foi empregada para análise exploratória para identificar as diferenças bioquímicas entre os grupos reveladas pelas bandas Raman. Para tanto, as variáveis do PCA: pontuações dos componentes principais (scores), que são projeções do conjunto de dados nos novos eixos dos componentes principais (os eixos que maximizam a variância nos dados), e os coeficientes dos componentes principais (carregamentos ou PCs), que são as projeções (as intensidades) dos dados nesses novos eixos, foram extraídas e plotadas (Joliffe; Cadima, 2016). Os scores assemelham-se aos espectros Raman, com picos positivos e negativos nas posições dos compostos presentes na urina, e em conjunto com os PCs, podem apresentar significado químico específico e ser interpretados como diferenças na composição bioquímica dos grupos (Beattie et al.,2021). Portanto, as características espectrais apresentadas nos scores foram correlacionadas com os compostos encontrados nas

amostras de urina, e os PCs foram utilizados para identificar onde ocorrem essas diferenças. O cálculo da PCA foi realizado no software Matlab.

O teste t de Student ($p < 0,05$, software InStat v.3.05) precedido por um teste de normalidade (Kolmo-gorov-Smirnov, $p < 0,1$) foi aplicado aos PCs para identificar qual deles apresentou diferença nos grupos CT e DM e HAS relacionados às informações bioquímicas apresentadas nos escores.

Um modelo espectral baseado na técnica de regressão PLS foi aplicado aos espectros Raman da urina para estimar as concentrações de ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total usando o ensaio espectrofotométrico (padrão ouro) como entrada. O modelo considerou as informações espectrais do sinal Raman como variáveis independentes (dados x), e as concentrações determinadas por análise bioquímica convencional (espectrofotometria) como variáveis dependentes (dados y) ou a concentração real. Foi utilizada a validação cruzada leave-one-out, onde $n-1$ amostras foram usadas no modelo de regressão PLS, e as concentrações de uma amostra deixada de fora foram previstas usando um certo número de variáveis latentes (LVs). O desempenho do modelo foi avaliado pela raiz do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSEcv) e pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), onde o melhor modelo é aquele que fornece o RMSEcv mínimo e o r máximo à medida que o número de LV é somado ao modelo.

Modelos discriminantes baseados em análise discriminante linear (LDA) e regressão PLS (PLS-DA) foram usados para classificar os sujeitos em grupos CT e DM e HAS. Em todos os casos, as variáveis dependentes (dados y) foram classes de grupos ou categorias, sendo a categoria "1" amostras dentro dos valores de referência (CT) dos compostos e categoria "2" as amostras fora dos valores de referência (DM e HAS). As variáveis independentes (x dados) consideradas em cada modelo foram: a) as concentrações de creatinina, ureia, glicose, fosfato e proteína total obtidas por análise espectrofotométrica, modelada por LDA; b) as concentrações dos compostos ensaiadas por espectroscopia Raman, também modeladas por LDA; e c) todo o conjunto de dados do espectro Raman, modelado por PLS-DA. Nos modelos PLS-DA, o desempenho é comumente avaliado pela acurácia geral (número de classificações corretas dividido pelo número de casos) (Baratloo et al., 2015), onde o melhor modelo é aquele que fornece a maior acurácia à medida que LVs são adicionados ao modelo.

O software Chemoface (Nunes et al., 2012) foi usado para realizar PCA, PLS e PLS-DA. Os passos para realizar PCA, regressão PLS e PLS-DA podem ser

encontrados em outros lugares, por exemplo, no Chemoface – Guia do Usuário (<http://www.ufla.br/chemoface>).

4. RESULTADOS

As características gerais dos participantes da pesquisa dos dois grupos estudados, encontram-se nas tabelas 3 e 4. Com relação ao grupo controle, este foi constituído de 45% de homens e 55% de mulheres, a média de idade foi de 31,7 (DP = $\pm 6,1$). Em relação ao grupo de pacientes diabéticos este foi constituído de 35% homens e 65% mulheres, a média de idade foi de 64,6 (DP = $\pm 9,0$).

Tabela 3 Características gerais dos participantes da pesquisa do grupo controle.

Variável	Homens (%)	N	Mulheres (%)	N
Grupo Controle		N = 9		N = 11
Grupo Etário				
25 – 35	44	4	56	6
36 – 44	46	5	54	5
Cor/Raça				
Branco	22	2	27	3
Negro	11	1	9	1
Pardo	67	6	64	7
Escolaridade				
Fundamental Completo	33	3	0	0
Médio Completo	45	4	4	36
Superior Completo	22	2	7	64
Atividade Física				
Sim	33	3	54	6
Não	67	6	46	5
Tabagismo				
Sim	44	4	9	1
Não	56	5	91	10

Tabela 4 Características gerais dos participantes da pesquisa do grupo de pacientes diabéticos e hipertensos.

Variável	Homens (%)	N	Mulheres (%)	N
Grupo DM e HAS		N = 7		N = 13
Grupo Etário				
45 – 65	72	5	54	7
66 – 79	28	2	46	6
Cor/Raça				
Branco	28	2	0	0
Negro	14	1	46	6
Pardo	58	4	54	7
Escolaridade				
Fundamental Incompleto	14	1	23	3
Fundamental Completo	43	3	46	6
Médio Completo	43	3	31	4
Atividade Física				
Sim	28	2	31	4
Não	72	5	69	9
Tabagismo				
Sim	57	4	38	5
Não	43	3	62	8

A Tabela 5 mostra os valores médios das concentrações de ureia, creatinina, fosfato, glicose e proteína total na urina dos dois grupos analisados, CT e DM & HAS, mensurados por espectrofotometria (padrão ouro). A análise comparativa entre os grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT e DM & HAS em relação aos cinco biomarcadores analisados ($p > 0,05$).

Tabela 5 Concentração dos principais biomarcadores da urina dos grupos CT e DM & HAS ensaiados por espectrofotometria. Valor de referência (VR) de Wu (2006) – SI convertido (mmol/L)

Biomarcadores Urinários	Valor de Referência (mmol/L)	Controle Concentração Média (\pm DP) (\pm SD mmol/L)	Controle Número total de amostras / Número de amostras fora do VR	DM & HAS Concentração Média (\pm DP) (\pm SD mmol/L)	DM & HAS Quantidade total de amostras / Nº de amostras acima do VR
Ureia	51.6 - 549 mmol/L (H) 46.9 - 580 mmol/L (M)	271 \pm 89 mmol/L	20/0	249 \pm 68 mmol/L	20/0
Creatinina	2.12 – 34.6 mmol/L (H) 1.4 – 28.9 mmol/L (M)	12.5 \pm 5.5 mmol/L	20/0	9.3 \pm 4.0 mmol/L	20/0
Glicose	< 0.83 mmol/L	0.23 \pm 0.04 mmol/L	20/0	17.3 \pm 38.7 mmol/L	20/5
Fosfato	1.6 - 61 mmol/L (H) 2.3 - 48 mmol/L (M)	23.4 \pm 14.1	20/0	17.2 \pm 9.9	20/0
Proteína total	1 - 15 mg/dL	14.7 \pm 5.5 mg/dL	20/9	15.6 \pm 7.2 mg/dL	20/7

H: homem M: mulher

A Figura 3 mostra os espectros Raman médios dos grupos CT e DM & HAS na faixa espectral de 400–1800 cm^{-1} , bem como o espectro de diferença (DM & HAS – CT). Os espectros são predominantemente dominados por picos Raman correspondentes a ureia, creatinina, glicose (particularmente para o grupo DM & HAS), fosfato e proteínas (também para o grupo DM & HAS). Os picos Raman de ureia estavam em 516 (sobreposição com glicose), 587, 1002 e 1157 cm^{-1} ; a creatinina estava em 678, 846 e 910 cm^{-1} (sobreposição com glicose); o fosfato estava em 880,

979 e 1080 cm^{-1} , a glicose estava em 446, 516 (sobreposição com ureia), 910 (sobreposição com creatinina), 1080 (sobreposição com fosfato) e 1127 cm^{-1} ; e as proteínas estavam na região entre 1250-1700 cm^{-1} . A sobreposição de algumas bandas Raman (por exemplo, o pico de 516 cm^{-1}) ocorre devido às semelhanças nas vibrações de energia da ligação simples de carbono em tais compostos orgânicos, particularmente os modos C-C, C-N e C-O (Dobrando C-C-O para glicose (Soderholm et al., 1999) e N-C-N e N-C-O dobrando para ureia (Frost et al., 2000)). A principal diferença entre os dois grupos foi a presença de picos de glicose (446, 516, 1080 e 1127 cm^{-1}). Esses picos Raman foram descritos anteriormente (Bispo et al., 2013; Saatkamp et al., 2016; Soderholm et al., 1999; Zhu et al., 2020)

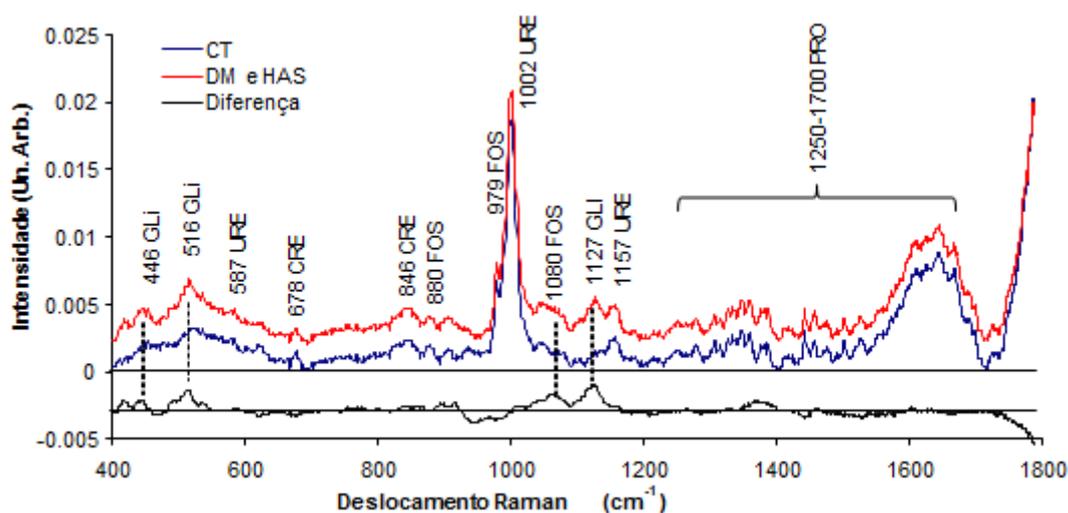


Figura 3 Espectros Raman médios dos grupos CT e DM & HAS e espectro de diferença (DM & HAS – CT). As atribuições dos principais picos foram detalhadas no texto. Os espectros foram deslocados para maior clareza. GLI: glicose; URE: ureia; CRE: creatinina; FOS: fosfato; PRO: proteína total.

A análise exploratória usando PCA foi usada para revelar diferenças nas características Raman dos grupos CT e DM & HAS. Altas variações espectrais foram encontradas nos primeiros seis componentes principais (> 98% da variância espectral), então as seis variáveis dos componentes principais (PCs e Escores foram plotadas (Figura 4).

O Escore 1 mostrou as características espectrais gerais dos compostos encontrados na urina: creatinina (678 cm^{-1}), fosfato (979 cm^{-1}) e ureia (1002 e 1157

cm⁻¹), PC 1 mostrou que não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

O Escore 2 apresentou traços espectrais característicos positivos e negativos, sendo os positivos atribuídos ao fosfato (979 cm⁻¹) e ureia (1003 cm⁻¹) e os negativos atribuídos à glicose (516, 850, 908, 1061, 1125, 1360, e 1459 cm⁻¹), o PC 2 mostrou que não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$), apesar da presença de características glicêmicas mais elevadas no grupo DM & HAS (PC 2 negativo e características glicêmicas negativas no escore 2), sugerindo que alguns indivíduos podem não ter um controle de glicose adequado.

O Escore 3 mostrou características espectrais negativas atribuídas a glicose (515, 1062, 1123 1371 e 1463 cm⁻¹) e ureia (1004 cm⁻¹), PC 3 mostrou que há diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), onde o grupo CT estava com menores quantidades de glicose e ureia (visto pelos valores positivos de PC 3 e características negativas do escore 3), sendo a glicosúria uma característica clínica esperada em indivíduos do grupo DM & HAS sem o devido controle.

O Escore 4 evidenciou características espectrais negativas atribuídas a proteínas (características sugeridas de albumina) em 853, 895, 943, 1000, 1342, 1449 e 1659 cm⁻¹ (Giansante et al., 2022). O PC 4 apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), com menor intensidade para o grupo DM & HAS (características proteicas negativas e PC 4 positivo); isso pode sugerir proteinúria em alguns indivíduos.

O Escore 5 mostrou características espectrais positivas de proteínas (622, 941, 1000 e 1443 cm⁻¹), e características negativas de proteínas (788, 868, 888, 1370, 1408, 1428 e 1635 cm⁻¹), O PC 5 mostrou uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), e as características negativas que aparecem no grupo DM & HAS (PC 5 negativo) sugerem que a proteinúria está ocorrendo neste grupo.

O Escore 6 mostrou características espectrais positivas de proteínas/aminoácidos (489, 630, 678, 791, 843, 943, 983, 1060, 1136, 1216, 1364, 1390, 1419 e 1606 cm⁻¹) e características negativas atribuídas a amino ácidos (1006 cm⁻¹), O PC 6 não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$); a presença de características de proteínas e aminoácidos no escore 6 sem

diferença significativa entre os grupos sugere uma composição complexa da urina independentemente do grupo.

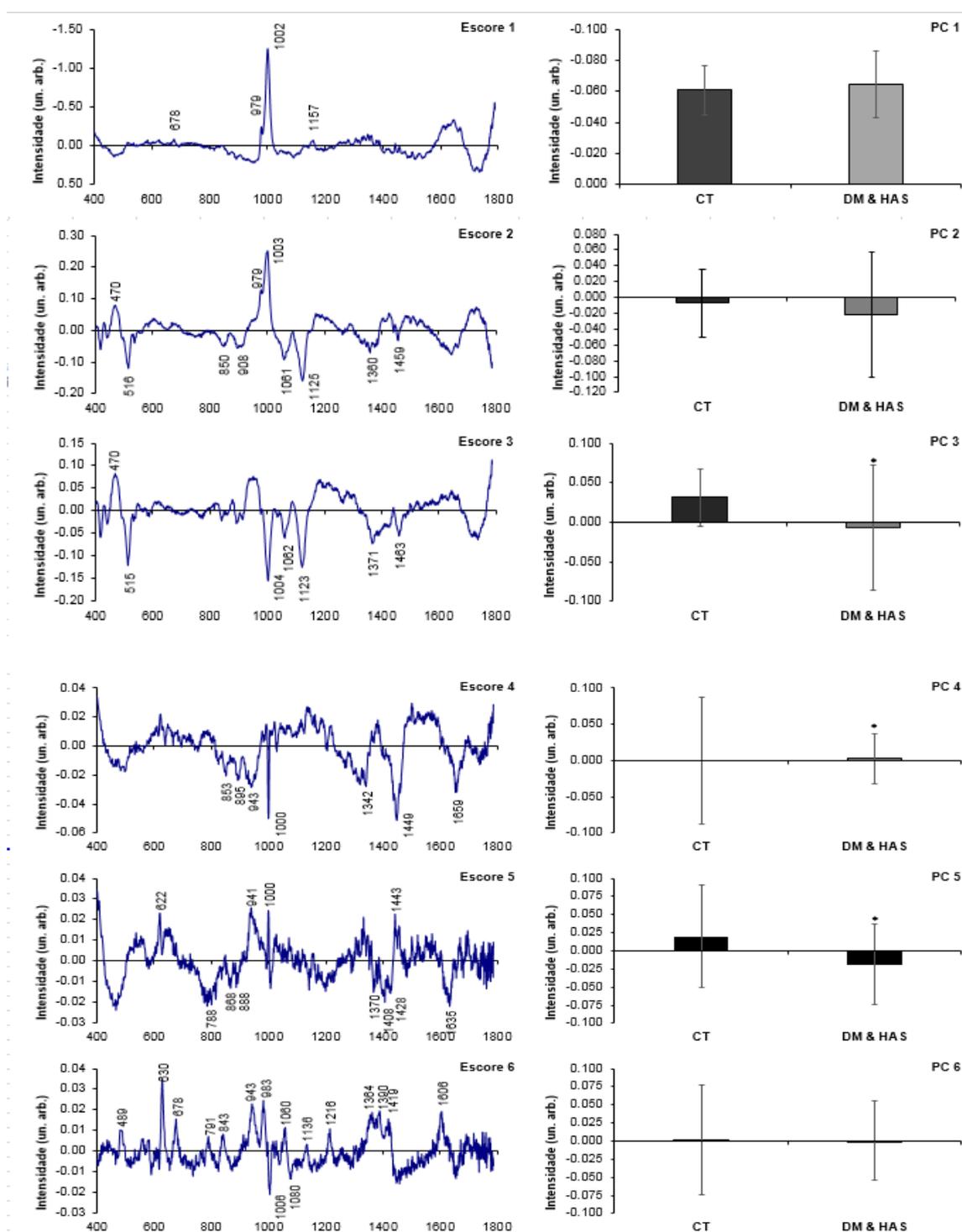


Figura 4 Gráfico das primeiras seis variáveis componentes principais (escores e PCs) extraídas do conjunto de dados Raman. As atribuições bioquímicas observadas nos escores foram baseadas nas posições das bandas Raman comparadas com a literatura. PC3, PC4 e PC5 apresentaram diferenças estatística significativa entre os grupos (teste t, $p < 0,05^*$).

Para estimar as concentrações de compostos bioquímicos na urina, foram utilizados modelos de regressão espectral baseados em PLS, onde as informações espectrais do sinal Raman foram a variável independente (dados x), e as concentrações determinadas por análise bioquímica convencional (espectrofotometria) foram as variáveis dependentes (dados y) e consideraram a concentração real. A validação cruzada “*leave-one-out*” foi usada para prever as concentrações de uma amostra deixada de fora usando um certo número de variáveis latentes (VLs) que apresentaram o maior coeficiente de correlação (r). A Figura 5 apresenta as correlações entre as concentrações reais e estimadas dos diferentes biomarcadores. Os dados revelaram que a creatinina e a glicose foram os biomarcadores que apresentaram o melhor r entre as duas técnicas analisadas ($r = 0,68$ e $r = 0,98$, respectivamente), ambos com 8 VLs, e $RMSE_{cv} = 3,6$ e $5,1$ mmol/L, respectivamente.

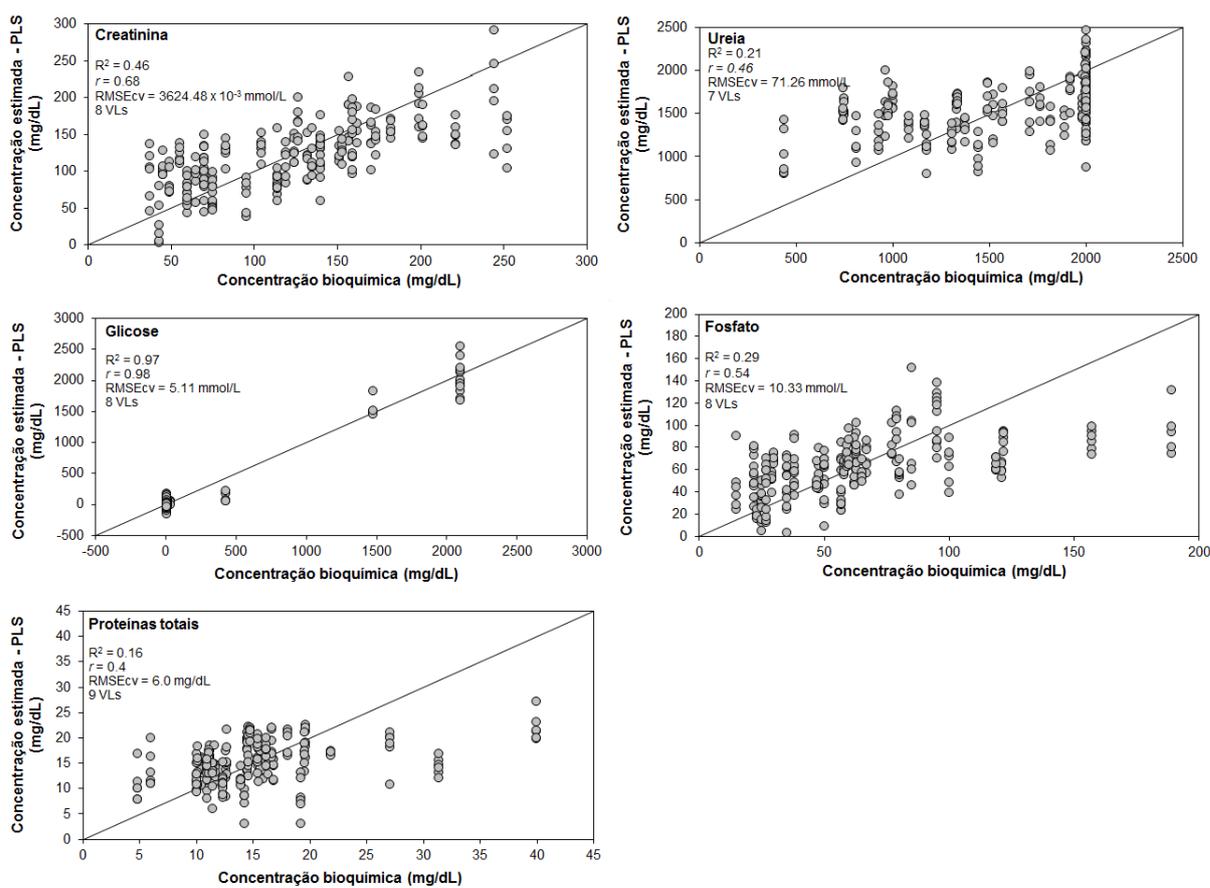


Figura 5 Correlação entre as concentrações estimadas dos biomarcadores uréia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total na urina determinada usando modelos espectrais baseados em regressão PLS com validação cruzada leave-one-out versus as concentrações determinadas pela espectrofotometria.

A Tabela 6 apresenta os resultados do modelo de discriminação baseado em LDA para classificar os sujeitos nos grupos CT e DM & HAS utilizando as concentrações de creatinina, ureia, glicose, fosfato e proteína total obtidas por análise espectrofotométrica. Além disso, é apresentada a classificação LDA utilizando os valores de concentração previstos pelo PLS, e a classificação PLS-DA baseada no conjunto de dados do espectro Raman considerando 7 LVs, onde todas as informações espectrais são consideradas. A maior precisão de 81,5% foi obtida pelo modelo PLS-DA usando todo o conjunto de dados do espectro Raman, com sensibilidade de 81,5% e especificidade de 81,4%, superando a precisão de 60,0% do LDA usando as concentrações do espectrofotométrico análise (padrão ouro).

Tabela 6 Resultados da classificação em grupos CT e DM & HAS utilizando o PLS-DA aplicado às concentrações dos biomarcadores obtidos por análise espectrofotométrica. A classificação usando espectros Raman foi realizada de duas maneiras diferentes com base nos valores de concentração dos biomarcadores previstos pelo PLS, e análise de todo o espectro Raman, considerando todas as informações espectrais

Classificação de acordo com os critérios clínicos	Classificação usando análise espectrofotométrica	
	Controle	DM & HAS
Controle (<i>n</i> = 20)	13	7
DM & HAS (<i>n</i> = 20)	9	11
Sensibilidade		55.0%
Especificidade		65.0%
Precisão		60.0%

Classificação de acordo com os critérios clínicos	Classificação usando espectros Raman (com base nos valores de concentração previstos pelo PLS)	
	Controle	DM & HAS
Controle (<i>n</i> = 113)	85	28
DM & HAS (<i>n</i> = 119)	42	77
Sensibilidade		64.7%
Especificidade		75.2%
Precisão		69.8%

Classificação de acordo com os critérios clínicos	Classificação usando espectros Raman [com base na análise do espectro completo (considerando todas as informações espectrais) por PLS (7 LVs)]	
	Controle	DM & HAS
Controle (<i>n</i> = 113)	91	22
DM & HAS (<i>n</i> = 119)	22	97
Sensibilidade		81.5%
Especificidade		81.4%
Precisão		81.5%

5. DISCUSSÃO

A população do estudo compreendeu indivíduos com diabetes e hipertensão e um grupo de pacientes saudáveis do município de Santarém – Pará (Brasil). Amostras de urina foram analisadas por espectroscopia Raman. As concentrações de elementos bioquímicos na urina (glicose, ureia, creatinina, fosfato e proteína total), foram previstas usando modelos de regressão multivariada por análise de componente principal (PCA) e PLS, aplicadas aos espectros raman e então comparadas as concentrações determinadas utilizando-se da metodologia espectrofotométrica padrão, objetivando determinar o desempenho analítico da ER.

No que se refere, a avaliação da concentração dos biomarcadores analisados em relação aos dois grupos, ficou evidenciado que, os dois grupos apresentaram ureia, creatinina e fosfato dentro dos valores de referência, o que era previsível, uma vez que a intenção do estudo foi de categorizar os pacientes participantes da pesquisa de acordo com o seu grupo e classificação clínica proposta. Com relação à glicose, o grupo CT apresentou concentração dentro dos valores de referência, contudo, 25% dos voluntários do grupo DM & HAS apresentaram níveis de glicose na urina acima do recomendado. Uma condição que pode justificar essa alteração de glicose de alguns indivíduos seria a falta de uma terapêutica medicamentosa correta, ou seja, alguns pacientes poderiam não estar fazendo o uso corretamente de suas medicações em suas rotinas diárias.

A hiperglicemia crônica está associada a um risco significativamente maior de desenvolver complicações micro e macrovasculares relacionadas ao diabetes. A detecção precoce de diabetes por meio de triagem aumenta a probabilidade de identificação de indivíduos assintomáticos e oferece tratamento adequado para reduzir o diabetes e suas complicações (Herman et al., 2015). Com relação à proteína total, 45% dos voluntários do grupo CT apresentaram concentração acima do valor de referência, enquanto que, no grupo DM & HAS, 35% dos voluntários apresentaram níveis de proteínas acima do recomendado na urina. Indivíduos com alta concentração proteica na urina pode estar relacionada a vários tipos de doenças renais, relacionados a proteinúria, e recentemente a ER já vem sendo discutida nesse contexto específico (Aitekenov et al., 2021).

É importante frisar que o recrutamento dos voluntários foi criteriosa nos dois grupos. No grupo CT, embora os voluntários apresentassem proteinúria, a taxa de filtração glomerular manteve-se dentro da faixa de normalidade (critério de inclusão), indicando assim que os indivíduos não apresentavam lesão renal. Este fato pode ter ocorrido porque os indivíduos saudáveis podem apresentar aumento da proteinúria após exercício físico, e no caso destes voluntários do CT estes não serem sedentários. A proteinúria pós-exercício é comumente observada após o exercício físico (Shepard, 2016).

É relevante ressaltar que, conforme a instrução técnica do fabricante do kit proteico utilizado, alguns compostos podem interferir na análise, como fosfato inorgânico, cálcio, magnésio, creatinina, glicose e ureia e produzem interferência positivas inferiores a 5%, enquanto que o ácido úrico, citrato de sódio, oxalato de sódio

e ascorbato produzem interferências negativas inferiores a 5%. De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes, a prevalência global de diabetes mellitus em adultos foi estimada em 8,8% em 2015 e prevê-se que aumente para 10,4% até 2040.

O diabetes mellitus pode levar a várias complicações de saúde, incluindo doenças cardiovasculares, disfunção renal, amputação e problemas de visão (Ogurtsova et al., 2017). Portanto, a prevenção primária do diabetes mellitus é extremamente importante para reduzir a carga populacional do DM e suas graves consequências.

A HAS é um fator de risco modificável importante e bem estabelecido para doenças cardiovasculares, doença arterial periférica e doenças renais (Petrie et al., 2018). Embora a HAS seja comum em pacientes com DM tipo 2, seu papel no desenvolvimento do DM é incerto. Vários estudos longitudinais mostraram que indivíduos com HAS ou mesmo pré-HAS tinham um risco maior de desenvolver DM do que indivíduos normotensos (Qin et al., 2012).

Saatkamp et al. (2016), desenvolveu um método para detectar as concentrações de ureia e creatinina na urina de jato médio (tipo 1) de indivíduos saudáveis e aplicando este método para quantificar esses metabólitos em pacientes com e sem lesão renal por DM e HAS. Os resultados mostraram valores de coeficiente de correlação de $r = 0,881$ e $r = 0,773$, e erros de predição $RMSE = 382 \text{ mg/dL}$ ($21,2 \text{ mmol/mL}$) e $RMSE = 51,2 \text{ mg/dL}$ ($2,8 \text{ mmol/L}$) para concentrações bioquímicas versus intensidades de pico de ureia e creatinina em 1006 cm^{-1} e creatinina em 681 cm^{-1} nos espectros Raman, respectivamente.

McMurdy & Berger (2003) relataram o primeiro uso da espectroscopia Raman para medir as concentrações de creatinina em amostras de urina sem alterações, de uma população de pacientes saudáveis, com um erro de validação cruzada de $4,9 \text{ mg/dL}$ ($0,3 \text{ mmol/mL}$) em comparação com o erro do método químico de $1,1 \text{ mg/dL}$ ($0,1 \text{ mmol/L}$). Em nosso estudo, mais precisamente no biomarcador creatinina, o valor de r foi de $=0,68$ e $RMSE_{cv}$ de $3,6 \text{ mmol/mL}$, respectivamente.

Recentemente, Carswell, Robertson e Senger (2022) realizaram um estudo preliminar de urina fresca misturada com sangue total e avaliada por espectroscopia Raman e quimiométrica (PCA e PLS); as quantidades de macro e microhematúria) No referido estudo foi feita a correlação de sangue adicionado na urina, apresentando um resultado de correlação, que compreende o valor de $0,91$ para o nível de hematúria (0-20% v/v) usando PLS. A precisão da previsão para detectar microhematúria (0-1%

v/v) foi de 91% usando PCA. Uma hipótese seria que a ER poderia ser uma opção viável de substituição dos métodos tradicionais, podendo ser utilizada nesta etapa como triagem (*screening*), com a vantagem de que a análise quantitativa das duas variáveis pode ser obtida em uma única medida, reduzindo o tempo de realização do exame. Tal benefício direcionaria pacientes com resultados alterados a procurar exames mais específicos e com menor erro, além das vantagens oferecidas pela ER, como eficácia e agilidade na liberação dos resultados, e se a terapêutica clínica adotada está tendo o efeito esperado.

É importante salientar que na prática, a avaliação bioquímica dos biomarcadores por espectrofotometria é realizada de forma individual, em medidas distintas, utilizando kits reagentes para cada análise, sendo que o princípio da metodologia varia de acordo com o kit empregado. Já no caso da análise por meio de ER, que em uma única análise é possível quantificar e identificar diversos componentes da urina. Inclusive, recente trabalho de Hu et al; (2021), evidenciaram que os biomarcadores podem ser detectados de forma eficiente pela espectroscopia Raman se realizada a leitura amostral da urina em ambas as porções.

Conforme o guia de instrução do espectrofotômetro analítico utilizado, alguns interferentes podem interferir na análise bioquímica, de acordo com cada especificidade. As substâncias interferentes (hemoglobina, bilirrubina conjugada, bilirrubina não conjugada e lipemia) foram testadas de acordo com a diretriz EP07-A2 (*CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005*), utilizando-se também das guias específicas de ensaio do fabricante dos kits (Atellica-Referência: ECre_215, IP, GluH_3 e UN_c), sendo concebido para ter $\leq 10\%$ de interferência pelos interferentes citados.

Bispo et al. (2013) identificaram potenciais biomarcadores na urina de pacientes diabéticos e hipertensos relacionados à doença renal a partir da análise destes analitos por Espectroscopia Raman. A análise discriminante quadrática (QDA) revelou características espectrais da uréia, creatinina e glicose nos espectros da urina. Observou-se redução nas concentrações de uréia e creatinina com a progressão da doença renal, enquanto a urina e a glicose aumentaram com a piora do prognóstico quando comparados ao grupo controle. O modelo QDA apresentou uma taxa de classificação geral de 70%. Assim, a espectroscopia Raman associada à PCA e QDA mostrou-se uma ferramenta valiosa para diagnosticar doenças renais e identificar

biomarcadores na urina humana e classificar amostras de urina de acordo com o estado da doença.

No presente estudo, foi realizada a discriminação dos espectros em grupos CT e DM & HAS utilizando o espectro Raman completo, considerando todas as informações espectrais, e a acurácia da espectroscopia Raman foi de 81,5%. Em um futuro próximo, um método baseado na espectroscopia Raman para quantificar os componentes da urina pode se tornar uma alternativa aos métodos existentes de urinálise ou até mesmo substituí-los. Os resultados sugerem que a espectroscopia Raman pode ser uma técnica de escolha para o acompanhamento de pacientes que podem desenvolver complicações decorrentes do DM & HAS. Os pacientes incluídos no presente estudo não apresentaram complicações decorrentes dessas duas doenças, na maioria das vezes são assintomáticos e, portanto, procuram atendimento médico ou aderem ao tratamento quando já apresentam lesões nos órgãos-alvo. Esse grupo está no limite entre normal e anormal, onde o acompanhamento clínico com diagnóstico sensível é essencial para reduzir a progressão e danos em órgãos como o rim e o sistema circulatório. Ressalta-se que a discriminação com os biomarcadores comumente utilizados em análises bioquímicas convencionais apresentou acurácia de apenas 60%, indicando a necessidade de novos métodos analíticos serem estudados e inseridos na prática médica. Dessa forma, a classificação clínica e laboratorial divergente será minimizada, para garantir a terapia mais adequada para cada caso.

A espectroscopia Raman pode ser uma opção viável para substituir os métodos tradicionais no monitoramento de pacientes que podem desenvolver complicações decorrentes de DM & HAS, com a vantagem de que a análise quantitativa das cinco variáveis pode ser obtida a partir de uma única amostra, reduzindo assim o tempo do exame. Esse benefício incentivaria os pacientes com resultados alterados detectados em um ensaio Raman a procurar exames mais específicos com menores taxas de erro.

6. CONCLUSÃO

A análise exploratória por PCA aplicada aos espectros Raman da urina de controles (CT) comparados a indivíduos diabéticos e hipertensos (DM & HAS) mostrou que houve diferenças qualitativas na composição bioquímica da urina, picos relacionados à glicose e proteína total.

O modelo de regressão PLS foi capaz de estimar a concentração dos biomarcadores ureia, creatinina, glicose, fosfato e proteína total; creatinina e glicose foram os biomarcadores que apresentaram o melhor coeficiente de correlação (r) entre as duas técnicas analisadas ($r = 0,68$ e $r = 0,98$, respectivamente), ambas com 8 LVs e $RMS_{ecv} = 3,6$ e $5,1$ mmol/L (41 e 92 mg /dL), respectivamente.

A análise discriminante por PLS-DA utilizando todo o conjunto de dados de espectros foi capaz de diferenciar as amostras dos grupos em estudo, com uma acurácia (81,5%) maior em relação ao modelo LDA (60,0%) onde os valores de concentração da análise espectrométrica foram usados.

A partir desta pesquisa, estudos futuros são necessários, buscando analisar outros biomarcadores, que podem acarretar em complicações clínicas decorrentes de DM & HAS e que são capazes de levar ao desenvolvimento de doença renal em pacientes sem sinais clínicos de complicações para padronizar a técnica raman. Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o potencial promissor da ER para ser empregada como técnica óptica diagnóstica aplicada em urinálise.

REFERÊNCIAS

ABENSUR, H. **Biomarcadores na Nefrologia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011.

AITEKENOV, S; GAIPOV, A; BUKASOV, R; (2021) Review: Detection and quantification of proteins in human urine. **Talanta** 223 (Pt1):121718.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999

ALI, MK; BULLARD, KM; SAADDINE; JB, COWIE, CC; IMPERATORE, G; GREGG, EW. Achievement of goals in U.S. diabetes care, 1999-2010 [published correction appears in **N Engl J Med** 2013;369:587] *N Engl J Med* 2013;368:1613–1624

ALMEIDA, A. N. F.; CÁRDENAS, A. M. C. Caracterização epidemiológica de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 de uma Unidade Básica de Saúde de Macapá - AP - **Brasil. Rev. Ciênc. Amaz.** 1(1): 8, 2013.

American Diabetes Association Standards (ADA) of medical care in diabetes—2015. **Diabetes Care** 2015;38 (Suppl. 1):S1–S89

AREFIN, MS; KHAN, AH; ISLAM, R. (2018) Non-invasive blood glucose determination using near infrared LED in diffused reflectance method. **10th International Conference on Electrical and Computer Engineering (ICECE)**, 93-96

ARMSTRONG, JA. Urinalysis in Western culture: a brief history. **Kidney Int.** 2007;71(5):384–387

BALL, DW. Rayleigh and Raman Scattering. **Spectroscopy Int J.** 2001; 16(2):28-31.

BERG, JM; TYMOCZKO, JL; Stryer L. **Biochemistry**. 6º. WHFreeman and Company; New York: 2007. Protein Turnover and Amino Acid Catabolism; pp. 649–678.

BARATLOO, A.; HOSSEINI, M.; NEGIDA, A.; El Ashal, G. Part 1: Simple definition and calculation of accuracy, sensitivity and specificity. **Emerg (Tehran)**. 2015, 3(2), 48-49.

BERG, JM; TYMOCZKO, JL; GATTO JR. GJ, STRYER L (2015) Protein turnover and amino acid catabolism. In: **Biochemistry**, 8th edn. W. H. Freeman and Company, New York, pp 681-712.

BERGER, AJ; BRENNAN, JF; DASARI, RR; FELD, MS; ITZKAN, I; TANAKA, K. Inventors Apparatus and methods of Raman spectroscopy for analysis of blood gases and analytes. WO 1996029925 A3 (Patente). **United States of America**, 1997.

BEATTIE, J.R.; ESMONDE-WHITE, F.W.L. Exploration of principal component analysis: Deriving principal component analysis visually using spectra. **Appl Spectrosc.** 2021, 75(4), 361-375. <https://doi.org/10.1177/0003702820987847>

BISPO, JAM; VIEIRA, EES; SILVEIRA, L; FERNANDES AB (2013) 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. **J Biomed Opt** 18(8):087004 [doi:10.1117/1.JBO.18.8.087004].

BOTTINI, P.V.; GARLIPP, C.R. Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.42. n.3: 157-162, 2006.

BRUEN, D; DELANEY, C; FLORESA, L; DIAMOND, D (2017) Glucose sensing for diabetes monitoring: **Recent developments. Sensors** 17(8):1866

BRYZGUNOVA, OE; SKVORTSOVA, TE; KOLESNIKOVA, EV; STARIKOV, AV; RYKOVA, EY; VLASSOV, VV. et al. Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. **Ann N Y Acad Sci.** 2006;1075:334–40.

BUSE, JB; GINSBERG, HN; BAKRIS, GL; et al. .; American Heart Association; American Diabetes Association . Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Circulation** 2007;115:114–126

CASTRO, R.A.A.; MONCAU, J.E.C.; MARCOPITO, L.F. Prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica na Cidade de Formiga, MG. **Arq. Bras. Cardiol.** 88(3): 334-339, 2007.

CARSWELL, W.; ROBERTSON, J.L.; SENGER, R.S. Raman spectroscopic detection and quantification of macro- and microhematuria in human urine. **Appl Spectrosc.** 2022, 76(3), 273-283. <https://doi.org/10.1177/00037028211060853>

CAVALLARI, F.E.M.; LEITE, M.G.J.; MESTRINER, P.R.E. et al. Relação entre hipertensão arterial sistêmica e síndrome da apnéia obstrutiva do sono. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** 68(5): 619-22, 2002.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Chronic kidney disease surveillance system website.** <https://nccd.cdc.gov/CKD> . Accessed 6/30/2022

CHATFIELD, C; COLLINS, AJ. Introduction to Multivariate Statistics. London: **Chapman & Hall**; 1980. 246

CHAVES, C. D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **Revista J Bras Pato IMed Lab**, v. 46, n. 5, outubro 2010.

CHEN, C; YANG, L; ZHAO, J; et al (2020) Urine Raman spectroscopy for rapid and inexpensive diagnosis of chronic renal failure (CRF) using multiple classification algorithms. **Optik** 203:164043

CHENG, YJ; IMPERATORE, G; GEISS, LS; et al. . Secular changes in the age-specific prevalence of diabetes among U.S. adults: 1988-2010. **Diabetes Care** 2013;36:2690–2696

CHIRIZZI, D; MALITESTA, C. (2011) Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electrosynthesized poly(o-phenylenediamine) film with buffering capability. **Sens Actuators B Chem** 157(1):211-215

CLSI (2005) Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline – 2ed, 25(27). CLSI document. EP07-A2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute.**

COBAS, R; RODACKI, M; GIACAGLIA, L; CALLIARI, L; NORONHA, R; VALERIO, C; CUSTÓDIO, J; SANTOS, R; ZAJDENVERG, L; GABBAY, G; BERCOLUCI, M. **Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2.** Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes (2022). DOI: 10.29327/557753.2022-2, ISBN: 978-65-5941-622-6.

COSTA, G. F. M.; MACHADO, J. P.; DUARTE, J.L.; JAZAR, S. K.; ABRANTES, S. S. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de contagem por campo e contagem de Addis modificada utilizados para a análise do sedimento urinário. **RBAC**, vol. 38(4): 224-229, 2006.

COSTA, J.S.D.; BARCELLOS, F.C.; SCLOWITZ, M.L. et al. Prevalência de hipertensão arterial em adultos e fatores associados: um estudo de base populacional urbana em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** 88(1): 59-65, 2007.

COSTA, M. B.; CASTRO, A. P. A. Abordagem interdisciplinar no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2: da teoria à prática. Extramuros: **Rev. Ext. Univasf** 1(2): 30-37, 2013.

DAUDT, C. V. G. **Fatores de Risco de Doenças Não Transmissíveis em uma comunidade universitária do Sul do Brasil (UFRGS)**. 2013. Tese (Doutorado em Medicina: Epidemiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

DE SOUZA VIEIRA, EE; BISPO, JAM; SILVEIRA, L; FERNANDES, AB (2017) Discrimination model applied to urinalysis of patients with diabetes and hypertension aiming at diagnosis of chronic kidney disease by Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci** 32(7):1605-1613 [doi:10.1007/s10103-017-2288-5].

DELANGHE, J.; SPEECKAERT, M. Preanalytical requirements of urinalysis. **Biochemic Medica**, v.24: 89-104, 2014.

DUARTE, M. R.; CARMO, J. A.; GOES FILHO, S. et al. Análise do comportamento de autocuidado de homens diagnosticados com Diabetes Mellitus Tipo II. **Rev. Bras. Qualid. Vida** 5(2): 41-50, 2013.

EBERHARDT, K.; STIEBING, C.; MATTHÄUS, C.; SCHMITT, M.; POPP, J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. **Expert Rev Mol Diagn.** 2015, 15(6), 773-787. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1036744>

ENEJDER, AM; KOO, TW; OH, J; HUNTER, M; SASIC, S; FELD, MS; et al. Blood analysis by Raman spectroscopy. **Opt Lett.** 2002; 27:2004-6.

European Confederation of Laboratory Medicine. **European Urinalysis Guidelines**. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2000; 231: 1-86.

EVERALL, N; DAVIS, K; OWEN, H; PELLETIER, MJ; SLATER, J. Density mapping in poly(ethylene terephthalate) using a fiber-coupled Raman microprobe and Partial Least-Squares calibration. **Appl Spectrosc.** 1996; 50:388-93.

FARIA, A. N.; ZANELLA, M. T.; KOHLMAN, O. et al. Tratamento de Diabetes e Hipertensão no Paciente Obeso. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** São Paulo. 46(2): 137-142, 2002.

FLORES-GUERRERO, JL; MUÑOZ-MORALES, A; NAREA-JIMENEZ, F; et al (2020) Novel assessment of urinary albumin excretion in type 2 diabetes patients by Raman spectroscopy. **Diagnostics.** 10(3):141. doi:10.3390/diagnostics10030141.

FOLEY, RN (2009) Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. **Clin J Am Soc Nephrol** 4(6):1136-1139

FOWLER, MJ. Complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes . **Clin Diabetes** (2008) 26 :77–82.

FROST, R.L.; KRISTOF, J.; RINTOUL, L.; KLOPROGGE, J.T. Raman spectroscopy of urea and urea-intercalated kaolinites at 77 K. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** 2000, 56A(9), 1681-1691. [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(00\)00223-7](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(00)00223-7)

GIANSANTE, S; GIANA, HE; FERNANDES, AB; SILVEIRA, L; (2021) Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers Med Sci.**

GOODALL, BL; ROBINSON, AM; BROSSEAU, CL. Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy (E-SERS) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection. **Phys Chem.** 2013; 15(5):1382-8.

GOULART, ACC; SILVEIRA, L Jr; CARVALHO, HC; DORTA, CB; PACHECO, MTT; ZÂNGARO, RA. Diagnosing COVID-19 in human serum using Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci.** 2022, 37(4), 2217-2226. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03488-7>

GROSS, JL; SILVEIRO, SP; CAMARGO, JL; et al (2002) Diabetes Mellitus: diagnosis, classification and glucose control evaluation. **Arq Bras Endocrinol Metab** 46(1):16-26 [doi:10.1590/S0004-27302002000100004].

GUIMARÃES, A. E. PACHECO, M. T. T. SILVEIRA JR. et al. NearInfrared Raman Spectroscopy (NIRS): a technique for doping control. **Spectroscopy Int. J.** 20: 185-194, 2006.

GULEKEN, Z.; BULUT, H.; BULUT, B.; PAJA, W.; PARLINSKA-WOJTAN, M.; Depciuch, J. Correlation between endometriomas volume and Raman spectra. Attempting to use Raman spectroscopy in the diagnosis of endometrioma. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2022, 274, 121119. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121119>

GUYTON, AC: **Fisiologia Humana**, 10ª edição, Editora Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

GUYTON, AC: **Fisiologia Humana**, 6ª edição, Editora Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 1988.

HANLON, EB; MANOHARAN, R; KOO, T-W; SHAFER, KE; MOTZ, JT; FITZMAURICE, M; et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys Med Biol.** 2000; 45(2):R1.

HARLOPE, M; DAVIS, J; ESPINA, V (2016) Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery. **Expert Rev Proteomics** 13(6):609-626

HEATHCOTE, KL; WILSON, MP; QUEST, DW; WILSON, TW; (2009) Prevalence and duration of exercise induced albuminuria in healthy people. **Clin Invest Med** 32(4):E261-E265

HENNEBERG, J. R. **AVALIAÇÃO DA ANÁLISE MICROSCÓPICA TRADICIONAL E DO ANALISADOR AUTOMATIZADO IQ 200® NO EXAME DE URINA.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

HEGGENDOMN, L. H.; SILVA, N. de A.; CUNHA, G. A. Urinálise: A Importância da sedimentoscopia em Exames Físico-Químicos Normais. **REB**, v.7, p.431-443, 2014.

HENNEBERG, J. R.; HENNEBERG, R.; NASCIMENTO, A. J. do; KUSSEN, G.; BARRETO, F. C.; HAUSER, A.. Comparison between Manual Methods and Automated Analyzer iQ200®(Iris Diagnostics): A Study for the Optimization of Urinalysis. **Int J Lab Med Res** 2015, 2: 108.

HENRY, JB. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Manoel Ltda, 1999.

HERMAN, WH; YE, W; GRIFFIN, SJ; et al (2015) Early detection and treatment of type 2 diabetes reduce cardiovascular morbidity and mortality: a simulation of the results of the Anglo-Danish-Dutch study of intensive treatment in people with screen-detected diabetes in primary care (ADDITION-Europe). **Diabetes Care** 38(8):1449-1455

HU, D; XU, X; ZHAO, Z; et al (2021) Detecting urine metabolites of bladder cancer by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc** 247:119108

HUANG, R; HAN, S; LI, XS. Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography. **Anal Bioanal Chem**. 2013; 405(21):6815-22.

HUEFNER, A.; KUAN, W.; MASON, S.L.; MAHAJAN, S.; BARKER, R.A. Serum Raman spectroscopy as a diagnostic tool in patients with Huntington's disease. **Chem Sci**. 2020, 11, 525-533. <https://doi.org/10.1039/C9SC03711J>

IGNARRO, L.J; BUGA, G.M; Wei LH, BAUER, P.M; WU, G, del Soldato P. Papel da via arginina-óxido nítrico na regulação da proliferação de células do músculo liso vascular. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2001; 98 (7): 4202–8.

ITO, H; INOUE, H; HASEGAWA, K; HASEGAWA, Y; SHIMIZU, T; KIMURA, S. Use of surface-enhanced Raman scattering for detection of cancer-related serum-constituents in gastrointestinal cancer patients. **Nanomed-Nanotechnol**. 2013; 10(2014):599-608.

JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2016, 374(2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>

KAWASAKI et al., 2015. Urinary phosphorus excretion per creatinine clearance as a prognostic marker for progression of chronic kidney disease: a retrospective cohort study. **BMC Nephrol** . 2015; 16: 116.

KRINSKI, K.; ELSANGEDY, H. M.; GORLA, J. I. et al. Efeitos do exercício físico em indivíduos portadores de diabetes e hipertensão arterial sistêmica. **Revista Digital - Buenos Aires**. 10(93), Feb. 2006.

KUMAR, R; SINGH, GP; BARMAN, I; DINGARI, NC; NABI, G. A facile and real-time spectroscopic method for biofluid analysis in point-of-care diagnostics. **Bioanalysis**. 2013; 5(15):1853-61.

LI, M; DU, Y; ZHAO, F; et al (2015) Reagent- and separation-free measurements of urine creatinine concentration using stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS). **Biomed Opt Express** 6(3):849-858

LIU, H; WANG, X; LIU, S; LI, H; YUAN, X; FENG, B; BAI, H; ZHAO, B; Chu Y: Effects and mechanism of miR-23b on glucose-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 70: 149-160.

LOMBARDI, DR; WANG, C; SUN, B; FOUNTAIN, AW; VICKERS, TJ; MANN, CK; et al. Quantitative and qualitative analysis of some inorganic compounds by Raman spectroscopy. **Appl Spectrosc**. 1994; 48(7):875-83.

MALERBI, F.E.K. Ajustamento emocional à doença por pais de crianças e adolescentes portadores de diabetes. **Psic. Rev.** São Paulo 14(1): 75-108, 2005.

MARKIN, R. S.; WHALEN, S. A. Laboratory automation: trajectory, technology and tactics. **Clin Chem**, v. 46, n. 5, p. 764-71, 2000.

MCMURDY, JW; Berger, AJ; (2003) Raman spectroscopy-based creatinine measurement in urine samples from a multipatient population. **Appl Spectrosc** 57(5):522-525

MINAYO, M.C.S. **O desafio do conhecimento**. Pesquisa qualitativa em saúde. 12ª ed. São Paulo: Hucitec, 2010. 407p.

MONTERO, RM; COVIC, A; GNUDI, L; GOLDSMITH, D (2016) Diabetic nephropathy: what does the future hold? **Int Urol Nephrol** 48(1):99-113

MOREIRA, LP; ROCCO; DDFM; DA SILVA, AG et al (2020) Detecting creatine excreted in the urine of swimming athletes by means of Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci** 35

MOREIRA, S. S. C. R. **Avaliação do estado nutricional de idosos portadores de diabetes tipo 2 acompanhados no Centro de Saúde nº 04 de Ceilândia - DF. 2013.** 42p. Monografia (Bacharelado em Enfermagem) - Universidade de Brasília, Ceilândia.

MOURA, D.J.M.; BEZERRA, S.T.F.; MOREIRA, T.M.M. et al. Cuidado de enfermagem ao cliente com hipertensão: uma revisão bibliográfica. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, 64(4): 759-65, jul./ago. 2011.

NORMANNO, N; CA, CIARDIELLO, F; DE LUCA A, Pinto C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. **Cancer Treat Rev.** 2018;70:1–8.

NOVIKOV, IA (2018) Noninvasive determination of blood glucose concentration by comparing the eardrum and head skin temperatures. **Biomed Eng** 51:341-345

NUNES, CA; FREITAS, MP; PINHEIRO, ACM; BASTOS, SC; (2012) Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **J Braz Chem Soc** 23:2003-2010

OGURTSOVA, K; DA ROCHA FERNANDES, JD; HUANG, Y; et al (2017) IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract** 128:40-50

OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática.** Rio de Janeiro: Controllab, 2011. p

OPARIL, S; ACELAJADO, MC; BAKRIS, GL; et al (2018) Hypertension. **Nat Rev Dis Primers** 4:18014

PEPPERS, MP; GEHEB, M; DESAI, T; (1991) Endocrine crises. Hypophosphatemia and hyperphosphatemia. **Crit Care Clin** 7(1):201-214

PETRIE, JR; GUZIK, TJ; TOUYZ, RM; (2018) Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: clinical insights and vascular mechanisms. **Can J Cardiol** 34(5):575-584

PITTS, RF. A excreção de urina no cão. **Am J Physiol** – Conteúdo Legado. 1933; 106 (1):1–8.

PREMASIRI. W.R.; CLARKE, R.H.; WOMBLE, M.E. Urine analysis by laser Raman spectroscopy. **Lasers Surg. Med.** 28(4): 330-334, 2001.

QIN, X; LI, J; ZHANG, Y; et al (2012) Prevalence and associated factors of diabetes and impaired fasting glucose in Chinese hypertensive adults aged 45 to 75 years. **PLoS One** 7(8):e42538

RAMOS, G; MARINE, D.C. **Exames Bioquímicos relacionados a alterações renais.** Foco. Ano 5 - N° 6. Janeiro/Junho 2014.

REINE, NJ; LANGSTON, CE; (2005) Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. **Clin Tech Small Anim Pract** 20(1):2-10

RIDLEY, JW; (2018) Fundamentals of the study of urine and body fluids. In: Ridley JW (ed) Introduction to the study of body fluids. **Springer**, Cham, pp 1-7.

SAATKAMP, CJ; DE ALMEIDA, ML; BISPO, JAM; et al (2016) Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **J Biomed Opt** 21(3):037001

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; HOFFMANN, J.F. et al. Prevalência de diabetes e hipertensão no Brasil baseada em inquérito de morbidade auto-referida, Brasil, 2006. **Rev. Saúde Pública** 43(Supl. 2): 74-82, 2009.

SCHWINGSHACKL, L; HOFFMANN, G. Comparison of High vs. Normal/Low Protein Diets on Renal Function in Subjects without Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sands JM**, ed. PLoS ONE. 2014;9(5):e97656.

SENGER, RS; KAVURU, V; SULLIVAN, M; et al (2019) Spectral characteristics of urine specimens from healthy human volunteers analyzed using Raman chemometric urinalysis (**Rametric**) PLoS One 14(9):e0222115

SÖDERHOLM, S.; ROOS, Y.H.; MEINANDER, N.; HOTOKKA, M. Raman spectra of fructose and glucose in the amorphous and crystalline states. **J Raman Spectrosc.** 1999, 30(11), 1009-1018. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4555\(199911\)30:11<1009::AID-JRS436>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4555(199911)30:11<1009::AID-JRS436>3.0.CO;2-#)

SHAPIRO; A, GOFRIT, ON; PIZOV, G; et al (2011) Raman molecular imaging: a novel spectroscopic technique for diagnosis of bladder cancer in urine specimens. **Eur Urol** 59(1):106-12

SHEPHARD, RJ (2016) Exercise proteinuria and hematuria: Current knowledge and future directions. **J Sports Med Phys Fit** 56:1060-1076.

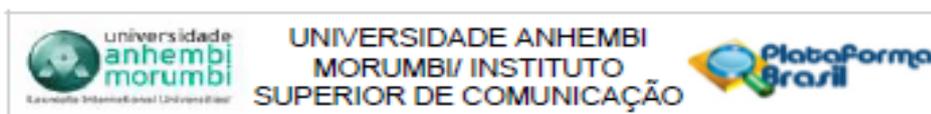
SILVEIRA, L. **Correlação entre a técnica de espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artéria coronárias humanas.** Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001. 98 p.

- SOARES, AA; EYFF, TF; CAMPANI, RB; et al (2009) Glomerular filtration rate measurement and prediction equations. **Clin Chem Lab Med** 47(9):1023-1032
- SOUZA, C. M. **Educação em Saúde: estratégia para o controle do Diabetes Mellitus na atenção primária no Brasil**. 2013. 34p. Monografia (Bacharelado em Enfermagem) - Universidade de Brasília, Ceilândia.
- SODRÉ, F.L; COSTA, J.C.B; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**. 2007; 43(5):329-37.
- STARITZBICHLER, R; HUNOLD, P; ESTRELA-LOPIS, I; HILDEBRAND, PW; ISERMANN, B; KAISER, T. Raman spectroscopy on blood serum samples of patients with end-stage liver disease. **PLoS One**. 2021, 16(9), e0256045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256045>
- STRASINGER, S. K.; LORENZO, M. S. Di. Urinalysis and a body fluids. Fifth edition. **Philadelphia. F.A. Davis Comapany**, 2008.
- STRASINGER, SK: **Urinálise & Fluidos Biológicos**, 3ª edição, Editorial Premier, São Paulo, 2000.
- TOSCANO, C.M. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não-transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. **Ciênc. Saúde Coletiva** 9(4): 885-895, 2004.
- TSUCHIDA, J; YADOHISA, H. Partial least-squares method for three-mode three-way datasets based on tucker model. **Procedia Computer Science**. 2017;114:234–241.
- VALE, S. F.; MIRANDA, J. Erros Pré-Analíticos no Exame de Urina de Rotina. 2012.
- VANDEL, A: **Renal Physiology**. McGraw-Hill, New York, 1980
- WANG, H; MALVADKAR, N; KOYTEK, S; et al (2010) Quantitative analysis of creatinine in urine by metalized nanostructured parylene. **J Biomed Opt** 15(2):027004
- WANG; TL; CHIANG, HK; LU, HH; PENG, FY. Semi-quantitative Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopic Creatinine Measurement in Human Urine Samples. **Opt Quant Electron**. 2005; 37(13-15):1415-22.
- WU, A (2006) **Tietz clinical guide to laboratory tests**. Elsevier, San Francisco.
- YOUNG, D. Laboratory automation: smart strategies and practical applications. **Clin Chem**, v. 46, n. 5, p. 740-5, 2000.

ZHU, W; WEN, B; JIE, L; et al (2020) Rapid and low-cost quantitative detection of creatinine in human urine with a portable Raman spectrometer. **Biosen Bioelectron** 154:112067

ŽUKOVSKAJA, O; RYABCHYKOV, O; STRAßBURGER, M; et al (2020) Towards Raman spectroscopy of urine as screening tool. **J Biophotonics** 13(1):e201900143

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação de Cistatina C e outros Biomarcadores de dano renal em pacientes diabéticos e hipertensos através da Espectroscopia Raman

Pesquisador: Adriana Barinha Fernandes Moretti

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91318518.9.0000.5492

Instituição Proponente: Universidade Anhembi Morumbi/ Instituto Superior de Comunicação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.717.746

Apresentação do Projeto:

A espectroscopia Raman destaca-se como ferramenta de análise dos componentes moleculares de diferentes tecidos, pois se sobressai às técnicas convencionais pela preservação da amostra, independência do uso de reagentes químicos e tempo reduzido de análise. A insuficiência renal aguda caracteriza-se pela perda súbita das funções regulatórias, excretórias e endócrinas dos rins, geralmente associando-se a doenças graves como hipertensão e diabetes. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a análise através de Espectroscopia Raman de ureia, creatinina e glicose no sangue e urina de pacientes diabéticos, hipertensos e renais crônicos, são promissores na detecção precoce de possíveis danos renais. O presente estudo irá avaliar o perfil dos espectros Raman da Cistatina C, Albumina e fosfato com outros biomarcadores de dano renal, analisando as alterações biológicas deste material (urina e plasma), através de um método simples e não invasivo, comparando com o grupo controle. A proposta deste estudo, é que esta técnica pode se tornar uma ferramenta importante na análise de biomarcadores de função renal de pacientes com predisposição ao acometimento renal.

Endereço: Rua Casa do Ator, 254 - 7º andar - Unidade 5
 Bairro: Vila Olímpia CEP: 04.546-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3847-3033 Fax: (11)3847-3232 E-mail: ctomea@anhemb.br



UNIVERSIDADE ANHEMBI
MORUMBI/ INSTITUTO
SUPERIOR DE COMUNICAÇÃO



Contribuição do Paciente: 2.717.748

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

• Correlacionar o perfil da Cistatina C e outros Biomarcadores de dano renal na urina e plasma de pacientes Renais Crônicos, Hipertensos e Diabéticos por Espectroscopia Raman.

Objetivo Secundário:

• Comparar a Cistatina C e outros biomarcadores de função renal no plasma por Espectroscopia Raman e Bioquímico; • Comparar o Espectro Raman da Albumina na urina e outros biomarcadores de função renal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

• Com o intuito de minimizar os riscos os participantes serão informados sobre o procedimento que será realizado, sendo que todas as dúvidas serão esclarecidas, incluindo a apresentação do TCLE. Os voluntários, por qualquer motivo, poderão desistir de participarem do estudo, sem constrangimento. • Os principais riscos associados ao projeto estão com relação a coleta de sangue e urina. No caso da coleta de sangue, será realizada por um profissional treinado, podendo ocorrer dor, hematoma e desconforto. Com relação a urina, como o paciente irá realizar a coleta, pode haver contaminação microbiana do frasco, onde a urina irá ser acondicionada.

Benefícios:

• Os participantes da pesquisa terão mais informações e orientações com relação a patologia e o tratamento; • A possibilidade de futuramente a ER ser empregada na análise de biomarcadores de função renal de pacientes com predisposição ao acometimento renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto com condições de realização, claramente definido em termos metodológicos e logísticos, caracterizando exequibilidade na proposta.

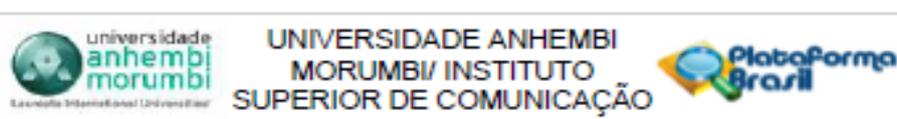
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados e contemplam as exigências da resolução 466/12.

Recomendações:

Sem recomendações.

Endereço: Rua Casa do Ator, 254 - 7º andar - Unidade 5
Bairro: Vila Olímpia CEP: 04.546-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3847-3033 Fax: (11)3847-3032 E-mail: ctores@anhemb.br



Continuação do Parecer: 2.717.748

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP UAM deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
4. Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP UAM deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.
5. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP UAM deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
6. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
7. Em conformidade com a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, faz-se obrigatório a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1069197.pdf	05/06/2018 13:08:26		Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/06/2018 13:02:20	Adriana Baminha Fernandes Moretti	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	05/06/2018 12:49:38	Adriana Baminha Fernandes Moretti	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração_da_instituicao_infraestrutur a.pdf	05/06/2018 12:48:56	Adriana Baminha Fernandes Moretti	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	01/06/2018 16:40:55	Adriana Baminha Fernandes Moretti	Acelto

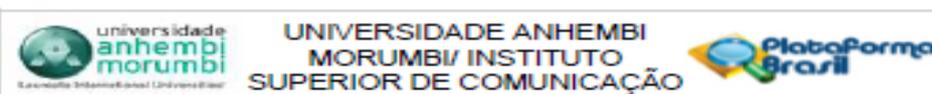
Situação do Parecer:

Aprovado

Neocessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Casa do Ator, 254 - 7º andar - Unidade 5
 Bairro: Vila Olímpia CEP: 04.545-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3847-3233 Fax: (11)3847-3232 E-mail: ctonas@anhembimorumbi.br

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 2.717.748

Não

SAO PAULO, 18 de Junho de 2018

Assinado por:
 CARLOS ROCHA OLIVEIRA
 (Coordenador)

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

Doutorado em Engenharia Biomédica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa intitulado: **Correlação de Cistatina C e outros biomarcadores de dano renal em pacientes diabéticos e hipertensos através da Espectroscopia Raman**. A proposta deste estudo é fazer a correlação de Cistatina C e outros Biomarcadores de dano renal na urina e plasma de pacientes Renais Crônicos, Hipertensos e Diabéticos por Espectroscopia Raman

Ressaltamos que sua participação é voluntária, portanto você não receberá pagamento e nem terá despesas com essa pesquisa. Os resultados obtidos poderão contribuir para que trabalhos que envolvam o material biológico (urina/sangue) seja mais uma evidência comprovada para avaliação de função de dano renal, utilizando-se a técnica de Espectroscopia Raman.

As informações obtidas serão utilizadas somente para a presente pesquisa. Em nenhum momento sua identidade será revelada inclusive quando forem publicados os resultados desta pesquisa, conforme disposto na Resolução 466/2012 - CNS, assegurando dessa forma a confidencialidade, sigilo e o anonimato das participantes do estudo. As informações fornecidas pelo senhor (a) permanecerão arquivadas por um período de 10 anos, e após esse tempo serão destruídas.

O motivo que nos levou a estudar esta problemática foi em virtude dos crescentes casos de pacientes diabéticos e hipertensos evoluírem para doença renal crônica e que hoje se torna um problema grave de saúde pública, na qual são gasto milhões em tratamento com hemodiálise, faz se necessária a investigação dos pacientes com alto risco de acometimento da doença renal crônica. Este estudo será uma extensão da dissertação de mestrado que analisou os biomarcadores renais na

urina de pacientes diabéticos, hipertensos e renais crônicos por espectroscopia raman, onde, foi possível concluir que esta técnica, é um instrumento favorável na identificação desses potenciais biomarcadores, evidenciado principalmente moléculas de glicose, ureia e creatinina. Para a Tese de Doutorado pretende-se estudar os mesmos grupos de pacientes, acrescentando os pacientes saudáveis, porém correlacionando com outros biomarcadores de função renal (Cistatina C, Fosfato e Albumina)

O risco da pesquisa está relacionado com as informações pessoais dos participantes serem divulgadas, que será minimizado com a explicação dos objetivos da pesquisa e apresentação do TCLE; Risco dos participantes ficarem constrangidos durante a coleta e desistirem da pesquisa, que será minimizado, porque antes da coleta será relatada a importância do estudo; Perda da privacidade; Quebra do anonimato; Risco de o participante evoluir a óbito durante a pesquisa; Risco de doer, hematoma e desconforto no ato da coleta de sangue.

Com relação aos benefícios, a espectroscopia Raman é uma técnica muito sensível e que futuramente poderá ser utilizada como diagnóstico diferencial para pacientes hipertensos e diabéticos, com o intuito de definir novos marcadores para estas patologias; Os participantes da pesquisa terão mais informações sobre a patologia, tratamento e risco para o desenvolvimento da insuficiência renal; Os participantes poderão ter dúvidas esclarecidas; Os pesquisadores terão conhecimento mais aprofundado sobre a doença e terapêutica, assim como será uma nova fonte de pesquisa através de diagnóstico óptico.

A Senhora (o), poderá retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição. Informamos que você tem direito a uma indenização segundo as leis vigentes caso você se sinta prejudicada pelo estudo. Em caso de dúvida deve-se entrar em contato com os pesquisadores: nos telefones: ou através do E-mail: ou com o orientador da pesquisa: Adriana Barrinha Fernandes Moretti, no telefone: (11) 97699-6918, ou através do E-mail: fernandesabm@gmail.com / pesquisadores: Elzo Everton de Sousa Vieira, no telefone: (93) 99170-0552, ou através do Email: elzoevertton@yahoo.com.br e Jeyse Aliana Martins Bispo, no telefone: (93) 99149-5356, ou através do email: jeysebispo@gmail.com

. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi, endereço: E-mail: cep@anhmebi.br

Após receber os esclarecimentos se você aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e se conter mais de uma página todas as páginas deverão ser rubricadas por todos os participantes do estudo, sendo que a primeira via ficará com o Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

DECLARAÇÃO do participante: Eu _____, declaro que compreendi as informações do que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão. Discuti com os pesquisadores Elzo Everton de Sousa Vieira e Jeyse Aliana Martins Bispo, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem a necessidade de justificar os motivos de minha desistência antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

SANTARÉM/PA, _____, de _____ de _____.

Assinatura do Participante

Assinatura do responsável pelo estudo

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR PRINCIPAL Eu _____,
abaixo assinado, declaro que forneci todas as informações sobre o trabalho em
questão. Sanei todas as dúvidas do participante sobre a pesquisa informei inclusive
sobre os riscos e benefícios de sua participação. Deixei claro quais são os propósitos
do estudo, os procedimentos a serem realizados.

Pesquisador principal

APÊNDICE B – FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO - ANAMNESE

Identificação _____

Nacionalidade :

Peso:

Altura:

Nome completo:

Escolaridade:

Nome completo da mãe/ responsável:

Data de Nascimento:

Gênero:

____/____/____

Telefone de contato:

Contato com quem?

Fone Res:

Comercial:

Celular:

Endereço:

Bairro:

Cidade

CEP

Profissão:

E-mail

Etnia: () branco () negro () oriental () índio () pardo ()
Outra _____

Descendência:

() afro-descendente () hispano-descendente () descendência
oriental

Antecedentes familiares

Pais-Consangüinidade: Sim() Não() **Grau de parentesco:**

Hipertensão Arterial HAS: Sim() Não() / **Pai() Mãe() Avós()**

Outro parente de 1º grau (). Qual(is)? _____

Descoberta com qual idade? _____

Diabetes Mellitos: Sim() Não() / **Pai() Mãe() Avós()**

Outro parente de 1º grau (). Qual(is)? _____

Descoberta com qual idade? _____

Dislipidemia: Sim () Não() / **Pai() Mãe() Avós()**

Outro parente de 1º grau (). Qual(is)? _____

Descoberta com qual idade? _____

Epilepsia: () Sim () Não Pai() Mãe() Avós()

Descoberta com qual idade? _____

Obesidade: Sim() Não() Pai() Mãe() Avós()

Outro parente de 1º grau (). Qual(is)? _____

Iniciada com qual idade? _____

Antecedentes Pessoais

Hipertensão Arterial (HAS) S() N() Desde qual idade?

Diabetes Melito (DM) S() N() Desde qual idade?

Dislipidemia S() N() Desde qual idade?

Ácido úrico S() N() Desde qual idade?

Renal Crônico S() N() Desde qual idade?

Hepatite () Sim () Não Qual tipo: () A () B () C

HIV S() N()

Cirurgia ou fraturas recentes? S() N() Qual?

Antecedentes cirúrgicos? S() N() Quais?

Antecedentes oncológicos? S() N() Qual?

Faz algum tratamento médico? S() N() Qual?

Faz uso de algum medicamento? S() N() Qual? Há quanto tempo?

Faz algum tipo de dieta? Qual?

Funcionamento intestinal diário? () Sim () Não / **Quantas vezes por dia?** _____

Se não, qual a frequência? _____

Pratica algum esporte? Qual? _____

Quantas vezes por semana? _____ **Durante quanto tempo?** _____

Consumo de café: Sim() Não() **Se sim:** _____ **copos/dia**

Consumo de chocolate: Sim() Não() **Qual a quantidade e frequência?**

Ingere quantos copos de líquido por dia? _____ **Preferencialmente ingere:**

Água () / Suco () **Qual?** _____ **Refrigerante () Qual?** _____ ()

Chá _____

Possui varizes ? **Grau:**

Fumante:() Sim () Não **Se sim, quantos cigarros por dia?**

Consome bebida alcoólica:() Sim () Não **Se sim, com qual frequência?**

Para sexo feminino:

Data da última menstruação:

É gestante? **Filhos?** **Quantos?**

Por quantos dias menstrua? _____

Qual o intervalo mensal em dias?

Usa algum medicamento?() Sim () Não **Qual ?**

Por quanto tempo? _____

Qual a Indicação?

Exames Laboratoriais de Função Renal?

() Sim () Não **Qual?**

Resultados:
