

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**DANIEL LOPES OMETTO**

**INVESTIGAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA SALIVA  
APÓS UM PROCEDIMENTO QUIROPÁTICO USANDO ESPECTROSCOPIA  
RAMAN.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, junho 2023**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**DANIEL LOPES OMETTO**

**INVESTIGAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA SALIVA  
APÓS UM PROCEDIMENTO QUIROPRÁTICO USANDO ESPECTROSCOPIA  
RAMAN.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Co-orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, junho 2023

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**DANIEL LOPES OMETTO**

**INVESTIGAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA SALIVA  
APÓS UM PROCEDIMENTO QUIROPRÁTICO USANDO ESPECTROSCOPIA  
RAMAN.**

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

**Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco - Orientador**

**Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr – Coorientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Kolberg – Membro externo**

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

## DANIEL LOPES OMETTO

Possui o título de bacharel em fisioterapia pela universidade Paulista (1999) e bacharel em quiropraxia pela universidade Anhembi Morumbi (2015), especialista em fisiologia do exercício na saúde e no envelhecimento pelo Centro de estudos em ciências da atividade física CECAFI (2001), especialista insuficiência cardíaca e respiratória em UTI monitorização e tratamento pelo AC CAMARGO (2004) cursou a residência em fisioterapia oferecida pela Casa de Saúde Santa Marcelina (2002), atualmente leciona como docente do curso bacharel de quiropraxia na universidade Anhembi Morumbi.

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

O65i	Ometto, Daniel Lopes Investigação das características bioquímicas da saliva após um Procedimento quiroprática usando espectroscopia Raman / Daniel Lopes Ometto – 2023. 49f ; 30 cm.  Orientador: Marcos Tadeu Tavares Pacheco. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2023. Bibliografia: f. 44-49.  1. Engenharia Biomédica. 2. Quiropraxia. 3. Somato-visceral. 4. Raman. 5. Saliva-tirosina. I. Título.  CDD 610.28
------	--

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família este que sempre foi o motivo e meus meios de crescer como pessoa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha esposa que sempre me apoiou nas minhas escolhas mesmo que sabendo das dificuldades vindouras.

Agradeço a ao meu orientador Dr. Marcos Tadeu Pacheco que permitiu e guiou neste processo de produção de conhecimento científico e tanto contribuiu para que esta pesquisa possuísse o profissionalismo de um bom pesquisador.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Landulfo Silveira Jr. Por toda a disponibilidade e compartilhamento de visões e ideias que tanto contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos docentes do programa de pós-graduação stricto sensu por todas as aulas e dedicação.

Agradeço a Universidade Anhembi Morumbi pela bolsa de estudos que permitiu meu ingresso no programa de pós-graduação.

## RESUMO

Apesar da quiropraxia ser uma profissão conhecida há mais de um século e consagrada como uma das terapias complementares mais relevantes no cenário mundial atual, os mecanismos que levam esta profissão a ter tanta eficiência clínica ainda não são totalmente esclarecidos. Esta pesquisa tenta entender uma nuance destes mecanismos, em especial, a relação dos ajustes quiropráticos realizados na coluna vertebral e sua repercussão na fisiologia em geral, fazendo uso da saliva como um biofluido que tem ganhado muito espaço no cenário clínico devido a facilidade de coleta e a ampla gama de marcadores fisiológicos presentes na mesma, ao se fazer uso da espectroscopia Raman, um meio de estudo que fornece um mapa de todas as substâncias presentes na fisiologia humana, e que com o auxílio de ferramentas estatísticas como a análise do componente principal pode fazer com que volumes muito grandes de dados possam ser sistematicamente analisados. Os meios para a realização deste estudo foram oferecidos pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi. Para tal, dezessete voluntários forneceram amostras de saliva antes de serem submetidos a um tratamento quiroprático e logo após o mesmo, os componentes principais da saliva foram calculados e comparados. Sendo que o resultado foi que um dos componentes apresentou grande relevância estatística  $P < 0.0001$  característico do aminoácido tirosina presente na saliva, sugerindo que uma única consulta quiroprática pode alterar a composição proteica da saliva, e em especial deste aminoácido.

Palavras Chave: Quiropraxia, somato-visceral, Raman, Saliva, tirosina.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SALIVA AFTER A CHIROPRACTIC PROCEDURE USING RAMAN SPECTROSCOPY

Despite chiropractic being a profession known for more than a century and enshrined as one of the most relevant complementary therapies in the current world scenario, the mechanisms that lead this profession to be so clinically efficient are still not fully understood. This research tries to understand a nuance of these mechanisms, in particular, the relationship of chiropractic adjustments performed on the spine and their impact on physiology in general, making use of saliva as a biofluid that has gained a lot of space in the clinical scenario due to the ease of collection and the wide range of physiological markers present in it, when making use of Raman spectroscopy, a means of study that provides a map of all substances present in human physiology, and that with the aid of statistical tools such as principal component analysis can make very large volumes of data systematically analysable. The means for carrying out this study were offered by the *Stricto Sensu* Graduate Program in Biomedical Engineering at Anhembi Morumbi University. For this, seventeen volunteers provided saliva samples before being submitted to a chiropractic treatment and soon after the same, the main components of the saliva were calculated and compared. The result was that one of the components showed great statistical relevance  $P < 0.0001$  characteristic of the amino acid tyrosine present in saliva, suggesting that a single chiropractic consultation can change the protein composition of saliva, and in particular this amino acid.

Keywords: Chiropractic, somato-visceral, Raman, Saliva, tyrosine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espalhamento Raman da média das amostras de saliva , espalhamento Raman da média da água destilada e o resultado do espectro da saliva subtraído o espectro da água . O espectro corresponde à média de todas as coletas apresentando um deslocamento vertical afim de melhorar a visualização. (I,II,III e IV).....	27
Figura 2. Espectro Raman das quatro amostras de saliva coletadas numeradas de I – IV com o espectro da água subtraído de todas as amostras. Os espectros se apresentam sem grandes discrepâncias evidentes, onde a única exceção é o pico de em $879\text{ cm}^{-1}$ que se apresenta inferior no grupo pós consulta quiroprática. (IV). Os dados são apresentados com um deslocamento vertical afim de melhorar a visualização. ....	28
Figura 3. Dispersão dos valores das amostras I,II e III em azul e amostra IV em laranja, para o pico em $879\text{ cm}^{-1}$ , compatível com aminoácido tirosina, em relação à ordem das coletas e autovalores. ....	29
Figura 4. Valores da média e desvio padrão referentes ao pico $879\text{ cm}^{-1}$ , compatível com aminoácido tirosina, sugerindo uma diminuição dos valores no grupo IV quando comparado aos demais I,II e III. ....	29
Figura 5. Espalhamento Raman dos três primeiros componentes das amostras de saliva após a análise de componente principal. Esta técnica consiste em uma transformação linear que escolhe um novo sistema de coordenadas ortogonais para o conjunto de dados de maneira que a maior variância por qualquer projeção dos dados aparece no primeiro eixo PC1, a segunda no segundo eixo PC2 e assim sucessivamente. ....	30
Figura 6. Gráficos de barra da média, desvio padrão e valor $p$ dos cinco autovalores dos componentes principais comparando as amostras I, II, III na primeira barra com a amostra IV na segunda barra. Com suas respectivas variâncias em relação à amostra.....	34
Figura 7. Espalhamento Raman do primeiro componente principal, apresentando características proteicas. ....	35
Figura 8. Espalhamento Raman do segundo componente principal. Característico da tirosina. ....	36
Figura 10. Espalhamento Raman do terceiro componente principal, característico da arginina. ....	37
Figura 11. Espalhamento Raman do quarto componente principal, característico de fosfolipídios. ....	38

Figura 12. Espalhamento Raman do quinto componente principal, característico de fenilalanina. ....	38
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Calendário de procedimentos e coletas de saliva realizados na pesquisa. ....	23
Tabela 2 - Tabela com idade e gênero dos voluntários, demonstrando dados equilibrados entre ambos os gêneros, porém predominantemente jovens em especial no grupo masculino	26
Tabela 3 - Valores referentes à variância e variância acumulada em porcentagem de quanto cada componente principal contribui para a amostra. ....	31
Tabela 4 - Teste de Mann-Whitney ou valor P bicaudal dos cinco componentes principais comparando as amostras I, II e III ocorridas antes da consulta quiroprática com a amostra IV após a consulta quiroprática.....	34

## LISTA DE ABREVIACÕES

BJ PALMER

Bartlet Joshua Palmer

DD PALMER

Daniel David Palmer

PCA

Principal component analysis

Análise dos Componentes Principais

$\mu\text{L}$

Microlitros

N

Newtons

ms

Milissegundos

ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FT-IR

Infrared With Fourier transform

Infravermelho com Transformada de Fourier

SERS

Surface enhanced Raman spectroscopy

Espectroscopia Raman amplificada por

## SUMÁRIO

1.	Objetivos	1
1.1	Objetivos gerais	1
1.2	Objetivos específicos	1
2.	Introdução	2
2.1	A quiropraxia	2
2.2	Influências originais da quiropraxia	3
2.3	Teorias quiropráticas atuais	7
2.3.1	Teoria da compressão mecânica	7
2.3.2	Teoria do alívio da dor	8
2.3.3	teoria da resposta reflexa neurológica e reflexo somato-visceral	8
2.5	Considerações biomecânicas a respeito do ajuste quiroprático	10
3.	Espectroscopia Raman	16
3.1	O efeito Raman	16
3.2	Componentes de um sistema Raman	17
3.2.1	dispositivo de carga acoplada	17
3.2.2	Filtros ópticos	18
3.2.3	Espectrógrafos	18
3.2.4	Laser	18
3.3	Estudos Raman na saliva	19
4.	Ferramenta estatística	21
4.1	Análise do componente principal	21
5.	A saliva	13
6.	Métodos	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
7.	Resultados	26
8.	Discussão	40



## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVOS GERAIS**

Investigar a presença do reflexo somato-visceral na saliva de humanos após uma consulta quiroprática.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Monitorar e classificar se há oscilação da quantidade de substâncias normalmente presentes na saliva antes e depois de uma consulta quiroprática fazendo uso dos componentes principais constituintes da saliva humana através da espectroscopia Raman.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 A QUIROPRAXIA

A quiropraxia, a pesar de ser pouco conhecida no Brasil é uma profissão que remonta ao final do século XIX, mais precisamente 1895, onde através dos esforços de seu idealizador Daniel David Palmer, fez sua história em um período bastante conturbado da história americana, logo após a guerra civil e a expansão ferroviária para o oeste. Em um período de reorganização de um país, em vista de muitas mudanças e reestruturações sociais e políticas, a profissão cresceu e se estabeleceu se tornando uma das maiores profissões da área da saúde no cenário americano nos dias de hoje. (JOHSON et al, 2021)

Sua principal contribuição foi uma forma de filosofia não ortodoxa, que provavelmente a levou a ser a maior forma de medicina complementar e alternativa no cenário americano atual (Johson et al 2021), quiropraxistas atendem aproximadamente 190 milhões de consultas anualmente nos estados unidos da américa. (MEEKER et al , 2002) No ano de 2017, aproximadamente 87 países tinham a quiropraxia como profissão legalizada e em alguns, apenas a quiropraxia como principal acesso à profissionais de saúde. (HIMELFARB et al, 2020)

Um ponto importante que define a quiropraxia é de que os quiropraxistas acreditam que disfunções de coluna vertebral são uma condição crítica para a saúde integral e defendem que a melhor forma de corrigir e estimular a melhora destes distúrbios é através de procedimentos quiropráticos de natureza manual como na maior parte das técnicas quiropráticas, ou de natureza instrumental como defendido por outros grupos. Mas todas levam a manipulação vertebral como sua principal forma de intervenção clínica. (MEEKER et al , 2002)

O criador desta profissão, Daniel David Palmer foi um autodidata que migrou do Canada para o norte dos estados unidos e se estabeleceu em Davenport no estado de Iowa, e de lá começou a prática da quiropraxia que evoluiu para o ensino da quiropraxia com a primeira escola de quiropraxia fundada no ano de 1896 na cidade de Davenport no estado de Iowa, a Palmer “*School of Chiropractic*” dentre os primeiros formados na primeira turma de quiropraxistas estavam dois indivíduos de grande importância na profissão. Um deles chamado Bartlett Joshua Palmer (B.J.Palmer), filho do fundador; e outro chamado Solon M. Langworthy, este que já possuía um diploma de terapeuta manual concedido pela “*College of Manual Therapeutics in Kansas City*” (KEATING et al , 2004)

No ano de 1902, devido a perseguição e ameaça de prisão por exercício ilegal da medicina, o fundador Daniel David Palmer deixou a escola sob a tutela de seu filho B J Palmer, com apenas 20 anos de idade e recém formado na escola de seu pai. B J Palmer foi obrigado a

lidar com os entraves de administração da escola que levava o nome da família, seu pai também deixou um débito de 8 mil dólares. B J Palmer como um homem de personalidade forte, foi em busca de um empréstimo de 16 mil dólares, uma quantia exorbitante para a época, quitou as dívidas de seu pai e investiu o restante na escola trazendo a mesma à saúde financeira. (KEATING et al, 2004)

No entanto, estes acontecimentos podem ter contribuído para que alguns colegas discordassem de algumas visões do jovem administrador da escola, este fato provavelmente contribuiu para a criação de uma segunda escola de quiropraxia que deu origem à primeira divisão ideológica da filosofia quiroprática.

Logo após terminar seus estudos, Solon M. Langworthy se mudou para outra cidade do estado de Iowa, a cidade de Cedar Rapids, e fundou em 1903 a segunda escola de quiropraxia da história a "*American School of Chiropractic & Nature Cure*" combinando a quiropraxia com outros tratamentos naturais e a osteopatia, passando a ensinar sua própria visão do que deveria ser a quiropraxia. (KEATING et al, 2004)

Já na primeira escola, a visão filosófica de como deveria ser a quiropraxia, não era igual entre pai e filho, D D Palmer e B J Palmer se desentenderam e o fundador da profissão abriu uma terceira faculdade no ano de 1908 na cidade de Portland no estado de Oregon a "*DD Palmer school of chiropractic*", é conhecido que Solon M Langworthy chegou a convidar DD Palmer a lecionar em sua escola, porém o mesmo recusou a oferta e comentou que não concordava em misturar a quiropraxia com outros tipos de curas da época. (KEATING et al, 2004)

Ou seja, logo em seus primórdios a quiropraxia iniciou com debates vigorosos em relação a sua filosofia, além de desenvolver concomitantemente visões e procedimentos diversos entre si, porém todos de origem quiroprática. Esta situação ainda se encontra em fervoroso debate uma vez que estas escolas desenvolveram linhas de raciocínios e filosofias que geraram outros pensadores e outras escolas até os dias de hoje, inclusive de como a quiropraxia funciona e quais os objetivos podem ser esperados após uma consulta quiroprática.

## 2.2 INFLUÊNCIAS ORIGINAIS DA QUIROPRAXIA

Sabe-se que o início da carreira do idealizador da quiropraxia foi como um magnetoterapeuta, mais conhecido atualmente como mesmerista, fazendo menção a Franz Anton Mesmer, que apresentou sua teoria ao mundo através de sua dissertação de doutorado na Universidade de Viena, em 1776, introduzindo o magnetismo animal como uma força vital não

mensurável e que poderia ser transferível em seres vivos. (KEATING et al, 2004) Estas terapias magnéticas ficaram muito populares na Europa tratando as mais diversas enfermidades da época e foram importadas para o Novo Mundo na década de 1830, onde cresceram para ser tão popular nos Estados Unidos da América quanto na Europa. (KEATING et al, 2004).

Ao longo do ano de 1896 Daniel David Palmer teorizou que a causas das doenças que afligiam a humanidade não poderiam ser de origem completamente vitalista e passou a apresentar como argumento a teoria de que as doenças eram causadas por inflamações, facilmente perceptíveis por aumentos da temperatura local no corpo dos enfermos, e que estas inflamações eram causadas por partes anatômicas desalinhadas, que devido ao atrito entre estas estruturas causariam aumento de calor e conseqüentemente inflamação, assim se distanciando da visão anterior. Logo, para “*desinflamar*” o tecido estas regiões deveriam ser conduzidas à sua localização original onde não causariam atritos, criando a ideia de que “o osso está fora do lugar”. Já em 1903, definiu que as estruturas anatômicas desalinhadas se encontravam majoritariamente na coluna vertebral, e que este mal funcionamento evoluiria para compressões mecânicas das raízes nervosas da coluna vertebral aumentando ou diminuindo os impulsos neurais que inervavam a maioria dos órgãos do corpo. Porém, ainda fazia uso da ideia metafísica de que existia uma inteligência inata que administrava o corpo humano, e que esta inteligência residia no sistema nervoso central em especial no encéfalo, o que se mostra considerável, uma vez que nesta época a ideia de que o cérebro seria o órgão organizador de toda a homeostase ainda não era aceita por toda comunidade científica. (KEATING et al, 2004).

Já seu aluno, Solon M. Langworthy, que fazia parte de uma família tradicional de Iowa, aparentemente detentora de recursos, realizou vários estudos em escolas de saúde e cura da época, porém sem registros específicos, onde possivelmente teve contato com a homeopatia, osteopatia, esta também criada no estado de Iowa anos antes da quiropraxia, e outras curas da época. Sabe se por biógrafos não autorizados que usava um diploma de curas manuais de uma escola em Kansas “*College of Manual Therapeutics in Kansas City*”. Logo após a conclusão de seus estudos com os Palmers em 1901, migrou para uma cidade a menos de 100 kms de distância chamada de Cedar Rapids e fundou um sanatório, este que se encontrava em uma mansão da região e que o mesmo se orgulhava de usar os seus vinte aposentos como consultórios, após poucos anos de atendimentos clínicos dos cidadãos da região, em 1903, transformou seu sanatório em uma escola de quiropraxia como já mencionado. Seu slogan era “No drugs, no knife, the horrors of hospital are gone.” (KEATING et al, 2004)

Sabe se por suas publicações que Langworthy usava uma série de ferramentas para a correção dos distúrbios vertebrais, porém sem maiores compromissos com o uso das mãos, fato

esse que essencialmente o afastava da visão da família Palmer, era comum o uso de macas de alongamento e tração com polias e alavancas mecânicas usadas na coluna vertebral, autores sugerem que Langworthy foi o primeiro quiropraxista a levar em consideração o espaço entre as duas vertebrae, chamado anatomicamente de forame intervertebral, por onde a raiz dos nervos vertebrais se projetam a partir da coluna como de suma importância para a quiropraxia, sugerindo uma busca por evidências anatomopatológicas. Assim como foi o primeiro quiropraxista a levar em consideração a ação da gravidade na coluna humana e suas consequências posturais, esta que provavelmente daria início à ideia de estudo da repercussão destas alterações na biomecânica humana em outras profissões. (KEATING et al, 2004)

Existe a possibilidade de que Langworthy tenha sido influenciado por um famoso médico de Viena, conhecido como "*bloodless surgeon*" slogan este usado pelo próprio Langworthy em uma de suas primeiras propagandas impressas, sabe-se que este médico realizou uma apresentação de sua técnica na Burton Opera House em Davenport por volta de 1902, e provas circunstanciais sugerem que Langworthy estava presente. Seu nome era Dr. Adolph Lorenz, e seu principal método de tratamento era sua máquina de alongamento, chamada pelo próprio como a máquina de "ajustar", curiosamente este termo se popularizou em todas as vertentes da quiropraxia como o procedimento de realizar um movimento rápido e curto usado pelos quiropraxistas para efetivar seu tratamento, o ajuste quiroprático. (GIBBONS, W. R., 1981)

Os maiores méritos de Langworthy são a criação e redação do primeiro livro publicado com o tema quiropraxia intitulado "*Modernized chiropractic*" publicado em 1906, A primeira sistematização de um currículo de escolas, com duração de dois anos, para o ensino da quiropraxia, a primeira publicação periódica sobre o assunto quiropraxia um jornal intitulado Backbone, ter colaborado para a primeira legislação reconhecendo a atuação do quiropraxista como profissão na história, no estado de Minesota. Além de ter sido a única vertente quiroprática que buscou entrar em diálogo com a medicina tradicional da época. (GIBBONS, W. R., 1981)

Bartlet Joshua Palmer foi provavelmente o maior influenciador dentre os três pioneiros da quiropraxia, ele ao contrário das outras figuras históricas citadas, esteve à frente de uma das mais, se não a mais, importante das escolas de quiropraxia e esteve na ponta de lança da defesa desta profissão por aproximadamente nada menos do que seis décadas, de 1902 até 1961. Muitos o consideram uma personalidade excêntrica, obscura e dominadora, outros o consideram como um líder visionário e carismático que causava uma forte impressão naqueles à sua volta. Dois médicos da época se referem a ele de forma bem distinta: Um professor de

medicina da universidade de Harvard chamado Wardwell, após uma visita na escola que quiropraxia em meados de 1940, se referiu à BJ Palmer como: “Só conheci três gênios na minha vida, BJ Palmer era um deles”. (WARDWELL, W. ,1982)

Enquanto o Illinois medical jornal em 1912 se refere a BJ como “O homem mais perigoso em Iowa fora de uma prisão, ele é insano paranoico, um homem a qual sua irresponsabilidade é criminal” (GIBBONS, W. R. , 1987)

Sabe-se que sua influência original foram as ideias de seu pai Daniel David Palmer, o qual se baseava em uma ideia, em parte baseada em alterações anatômicas e em parte baseada em metafísica, como já mencionada anteriormente. No entanto devido a sua longa permanência à frente da instituição quiroprática, B.J. pode compilar novas influências e passar por várias fases de maturação pessoal e profissional, alguns autores dividem estas fases em três, uma fase em que um jovem abruptamente se viu à frente de uma escola tendo que lidar com concorrentes, legislações e gestão e encargos financeiros. Outra fase em que mais centralizado, pode se concentrar mais em defender publicamente a quiropraxia contra a ameaça de exercício ilegal de medicina à qual levou milhares de quiropraxistas para a prisão na época. Esta fase é comumente declarada como os anos dourados da quiropraxia quando B.J. foi o dono de uma emissora de rádio, um jornal de publicações periódicas, uma editora com mais de 30 livros de sua autoria, e um dos primeiros laboratórios de radiologia do território americano apenas 13 anos após Roentgen fazer sua descoberta, além de criar uma série de hospitais quiropráticos que tratavam todos os tipos de doenças, incluindo um hospital quiroprático especializado em doenças psiquiátricas (GIBBONS, W. R., 1987). Nesta fase B.J. se tornou uma figura pública combativa, em especial contra a recém-nascida indústria farmacêutica baseada em remédios patenteados. Em seguida, uma terceira fase ao final de sua carreira onde seus esforços voltaram a ser mais introspectivos e filosóficos, culminando com sua grande contribuição para as técnicas quiropráticas, considerando que a maior contribuição de um quiropraxista seria a correção de distúrbios chamados complexos de subluxação vertebral entre as duas primeiras vertebra cervicais, e que distúrbios nesta região seriam a causa primária da maior parte dos problemas de saúde conhecidos na época. (GIBBONS, W. R., 1987)

Estas vertentes quiropráticas influenciaram de tal forma o início da quiropraxia que até os tempos modernos temos visões diferentes entre as universidades e conseqüentemente os profissionais da área.

## 2.3 TEORIAS QUIROPRÁTICAS ATUAIS

Como descrito anteriormente a quiropraxia é uma profissão que teve seu início no final do século XIX e de sua fundação para cá existem pesquisadores que procuram entender seu funcionamento, e com isso criam teorias para explicar seu sucesso clínico.

Várias teorias foram propostas durante este período, visto que cada pensador refletiu o pensamento de sua época. Uma das primeiras teorias.

Segundo os estudos publicados por Scott Haldeman em 2000, no ano de 1977 em uma instituição chamada "*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*" patrocinou um encontro com o intuito descrito de desenvolver uma teoria sobre o que eles chamaram de "*The Neurobiological Mechanisms in Manipulative Therapy*" que através da reunião de vários especialistas na área foi solicitado que fosse criado um artigo chamado de "*The Clinical Basis for Discussions of Mechanisms of Manipulative Therapy*" este foi um movimento quiroprático que ia contra a visão de outros grupos quiropráticos que se mantinham fieis à filosofia vitalista do início da quiropraxia. Este esforço foi o início de uma tentativa de se olhar a quiropraxia com uma visão mais científica criando critérios de teste para a hipótese de como a quiropraxia funcionava. (HALDEMAN, 2000)

### 2.3.1 Teoria da compressão mecânica

Este esforço culminou em três principais teorias, sem viés metafísico, discutidas pelos representantes, a primeira e mais antiga se baseava na teoria predominante da época, era a teoria da compressão neural, esta teoria propunha que o principal mecanismo do ajuste quiroprático se tratava da correção do complexo de subluxação vertebral, este que se caracteriza por uma relação biomecânica aberrante em um segmento vertebral e que pode comprimir mecanicamente as raízes neurais ou o canal medular, sendo assim, interferindo no funcionamento normal dos nervos afetados e com isso interferindo na comunicação com os órgãos alvo, tanto de forma aferente como eferente. (HALDEMAN, 2000)

Esta afirmação pode parecer evidente uma vez que é muito bem documentado as perturbações neurais causadas por osteofitoses e discos intervertebrais herniados na coluna vertebral, inclusive hipertrofias ligamentares que podem aumentar de tamanho e através da compressão mecânica limitar o fluxo sanguíneo de partes do nervo, o que acarretaria certamente em hipoxemia e irritações neurais de grandezas proporcionais, no entanto, existe uma carência de evidências de que o ajuste quiroprático possa restaurar esta perfusão no nervo afetado. (HALDEMAN, 2000)

### **2.3.2 Teoria do alívio da dor**

Outra teoria é a teoria do alívio da dor, que propões que o ajuste quiroprático possa agir como uma ferramenta de alívio da dor produzida através de estímulos mecânicos. Vernon sugeriu em sua pesquisa que o ajuste poderia causar a hipoalgesia, este fato poderia ser alcançado através de estímulo de estruturas espinhais, assim como na habilidade de um ajuste quiroprático estimular gatilhos cutâneos e musculares que possam desencadear respostas motoras de relaxamento ou estabilização que culminariam no alívio da dor, além disso, existem relatos do aumento da liberação central de endorfinas após os procedimentos quiropráticos. (VERMON, 1999)

No entanto a teoria do alívio da dor tem seus questionamentos, principalmente apoiados no fato de que a dor é um fenômeno complexo, não apenas com uma causa e um efeito, podendo estar subordinada estímulos psíquicos e sociais inviabilizando conjecturas simples a respeito do alívio ou não da dor após um procedimento. Outro fato relevante seria a do efeito momentâneo e não duradouro do alívio da dor por parte destes mecanismos, o que tornaria o procedimento quiroprático como um paliativo.

### **2.3.3 teorias da resposta reflexa neurológica e reflexo somato-visceral**

Já a teoria da resposta reflexa neural é uma teoria que se baseia na relação de controle das reações do sistema nervoso autônomo em resposta a estímulos somatoviscerais, onde uma disfunção articular de um segmento vertebral pode ser caracterizada por um comportamento aberrante de um segmento formado por duas vertebrae, causando aferências erráticas nas estruturas altamente inervadas ao redor da medula vertebral. Um exemplo destas estruturas são os músculos paravertebrais, ligamentos, articulações sinoviais nas facetas zigapofisárias, das meninges e disco intervertebral, cada uma destas estruturas é preenchida com receptores que detectam informações sobre estas estruturas, são estes detectores de adaptação lenta que com o intuito de monitorar a posição estática do segmento, detectores de adaptação rápida que detectam movimentos rápidos, assim como detectores inflamatórios e nociceptivos e de temperatura. Cada combinação destas informações sendo interpretadas e produzindo reações diferentes por parte do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. (HALDEMAN, 2000)

Estes mecanismos se tornam possíveis através do mecanismo de sensibilização central, onde acontece um aumento da excitabilidade dos neurônios do corno posterior da medula para

aquelas vias neuronais, caracterizando um aumento da entrada neuronal aferente de forma espontânea no sistema nervoso. Este efeito acontece devido a uma descarga aumentada de neurônios centrais para uma entrada aferente, ou por uma mudança de propriedade do campo receptivo dos neurônios envolvidos descritos pela plasticidade neural decorrente de um estímulo repetitivo. (COOK et al, 1987)

Denslow foi um dos primeiros pesquisadores a estudar sistematicamente a organização neural de áreas sensíveis no tecido paravertebral. Suas descobertas levaram a umas das justificativas predominantes para o uso clínico das manipulações de coluna vertebral, ou seja, a premissa de que alterações persistentes na entrada sensorial normal de um segmento vertebral funcional aumenta a excitabilidade de células neuronais ou circuitos da medula vertebral. (LEACH, 1994; KORR, 1975; DENSLOW, 1947)

Uma das visões desta teoria é a de que inferências sensoriais dos tecidos paravertebrais podem evocar reflexos viscerais que afetam o sistema nervoso autônomo simpático e podem alterar o funcionamento de órgãos alvo. Em geral, estímulos paravertebrais não nocivos parecem ter um efeito inibitório no fluxo simpático, enquanto estímulos nocivos parecem ter efeitos excitatórios do sistema nervoso simpático. (PICKAR, 2002)

Sato e Swenson aplicaram estímulos não nocivos à coluna vertebral de ratos em ambiente controlado, os estímulos eram caracterizados por impulsos mecânicos nas laterais dos processos espinhosos, enquanto as atividades do nervo renal adrenal, de características simpáticas foram monitoradas. Durante o experimento estes estímulos diminuíram a atividade deste nervo em 25% a 40 %, no entanto os estímulos duraram apenas 30 segundos e as respostas se atenuaram rapidamente. Concluíram que estímulos não nocivos aplicados à coluna vertebral inibem reflexamente o nível de atividade nervosa simpática por meio de um reflexo neurológico supramedular. (SATO E SWENSON, 1984)

Outro estudo interessante é a de que a estimulação mecânica dos tecidos paravertebrais pode ser suficiente para inibir a motilidade gástrica. A atividade mioelétrica da musculatura intestinal, que produz os movimentos peristálticos, de coelhos conscientes foi externamente diminuída através de estímulos mecânicos sustentados. Neste estudo não ficou claro se a estimulação mecânica foi nociva ou inócua, porém o efeito foi maior quando se aproximava da sexta vertebra torácica e diminuía à medida que o estímulo subia ou descia para outros segmentos craniais ou caudais. (DEBOER et al, 1988)

Já em estudos mais recentes estudando a produção de cortisol em humanos, 30 voluntários foram divididos igualmente em grupo controle, grupo que sofreu manipulações vertebrais cervicais e grupo que recebeu manipulações vertebrais torácicas, o estudo fez uso

de amostras de sangue e encontrou um aumento significativo do volume de cortisol nas amostras do grupo que recebeu procedimentos na coluna cervical, porém não houve alterações significantes entre o grupo placebo e o grupo que recebeu manipulações torácicas. Sugerindo que a localização do ajuste pode ter uma repercussão na produção deste hormônio (Manzano et al 2014) no entanto o enfoque deste estudo não foi a realização de um tratamento quiroprático completo, devido os grupos de amostra serem divididos por partes da coluna.

Valores estes que contrapõe a pesquisa realizada por Sampath et all, que encontrou uma diminuição, com relevância estatística, da quantidade de cortisol na saliva de 24 voluntários após 5min do procedimento quiroprático, porém este pesquisador não realizou uma consulta quiroprática adequada, se limitando a realizar um ajuste na região torácica sem mencionar se existia indicação clínica para a realização do ajuste (SAMPATH et al, 2017). Assim como Hughes publicou um estudo de caso de uma mulher sofrendo de distúrbio de ansiedade e cervicalgia que apresentou melhora tanto no quadro de cervicalgia quanto de ansiedade e níveis de cortisol sucessivamente, com a evolução do tratamento quiroprático ao longo de 6 semanas, neste estúdio de caso foi realizado um tratamento quiroprático completo incluindo terapias complementares com terapias musculares. (HUGHES, 2020)

A grande questão com a teoria reflexa neurológica é a de que partes deste modelo ainda se mantem hipotéticas, apresentando evidências demonstradas em curtos períodos em condições experimentais. Além disso, carece de mais experimentos em especial constatando se este efeito pode ser de longo o suficiente para produzir uma verdadeira mudança na função do órgão ou sintoma de forma prolongada e relevante. (HALDEMAN, 2000)

## 2.5 CONSIDERAÇÕES BIOMECÂNICAS A RESPEITO DO AJUSTE QUIROPRÁTICO

O ajuste quiroprático é conhecido como a manobra que um profissional de quiropraxia usa para tratar disfunções de coluna vertebral, esta manobra é entendida como um impulso vigoroso e específico em uma direção planejada em um determinado ponto da vertebra com o objetivo de propagar a força cinética para o corpo do paciente, sendo considerado uma manobra bastante complexa que demanda muito treinamento para ser realizada. O quiropraxista realiza um impulso, muitas vezes em mais de um vetor, controlando a velocidade a magnitude e a

direção deste impulso, variando estes fatores de acordo com seus objetivos clínicos. (BERGMANN, 1992)

A arte desta profissão se traduz na habilidade do quiropraxista em controlar estas características para atingir os objetivos clínicos desejados. A principal característica deste tipo de manobra é a de que ela deve ser realizada ao extremo final da amplitude de movimento normal, o assim chamado espaço para-fisiológico, mas não ultrapassando os limites anatômicos desta articulação. (BARTOL, 1995)

Algumas técnicas quiropráticas também são conhecidas por eventualmente produzir um som de estalido durante a manobra. Este som é característico da cavitação decorrente do deslocamento de gases dentro da articulação, isto ocorre devido à quebra da tensão superficial do fluido dentro da articulação decorrente do afastamento de estruturas que causam um efeito de pressão negativa atraindo o gás diluído em uma única bolha e com a vibração mecânica causada neste processo sendo captada como som por nossos ouvidos. (CONWAY, 1993; BRODEUR, 1995)

A técnica de ajuste mais utilizada por quiropraxistas é a técnica de impulso fazendo uso de uma alavanca curta, ou seja, o ponto de contato que receberá a força está muito próximo à articulação alvo, a uma alta velocidade e curta amplitude. Os pontos de contato preferidos são os processos transversos, os processos mamilares e os processos espinhosos de uma vertebra. (HALDEMAN, 1983)

Para ajustes realizados na pelve as espinhas ilíacas póstero superiores e póstero inferiores são preferíveis, assim como o tubérculo isquiático costuma ser usado. (PICKAR, 2002)

Herzog e colaboradores identificaram algumas características comuns à vários ajustes quiropráticos, em seus estudos identificou que dois procedimentos estavam presentes em todos os ajustes estes achados foram uma pré-carga imposta na articulação durante o procedimento de ajuste, seguido imediatamente por uma força de impulso mais intensa e de mesma direção. Este pesquisador utilizou neste estudo dois quiropraxistas treinados e quantificou o pico de impulso perpendicular ao ponto de contato da mão dos quiropraxistas na vertebra alvo e determinou que a pré-carga se encontrava entre 20 e 180 N, enquanto o impulso mais intenso foi de 220 até 550 N, frequentemente a pré-carga contribuía com 25% da carga do impulso principal, ainda neste estudo determinou que o ajuste completo durava em torno de 200 até 420ms. (HESSEL, 1990)

Outros autores chegaram à grandezas próximas sendo que para a coluna torácica as cargas variaram entre pré-carga de  $88 \pm 78$  N e pico de impulso de  $139 \pm 46$  N, e na região

sacroilíaca foram utilizadas forças de pré-carga de  $328 \pm 78$  N e impulso de  $399 \pm 119$  N ambas com velocidade próximas variando de  $150 \pm 77$  ms. (HERZOG, 1993; KAWCHUK, 1992; KAWCHUK, 1993; PICKAR, 2002)

No entanto estas cargas são bastante reduzidas quando se tratando de coluna cervical sendo a pré-carga variando de 0 a 50 N e pico de força de impulso variando de 40 a 120 N, sendo os ajustes cervicais mais rápidos que os ajustes restantes durando de 30 ms até 120 ms. (PICKAR, 2002)

### 3. A SALIVA

A saliva é um fluido único e os estudos sobre seus usos na medicina tem evoluído exponencialmente nos últimos dez anos, em especial pelos avanços na bioengenharia que possibilitaram uma análise mais precisa destes biofluidos (STRECKFUS et al, 2002) por este motivo se torna uma ótima escolha quando o objetivo é monitorar biomarcadores do metabolismo humano após os procedimentos. A vantagem do uso da saliva para fins diagnósticos em comparação com o sangue se dá principalmente devido a facilidade de coleta e a simples manutenção das amostras. Atualmente, o diagnóstico salivar é aplicado em medicina, odontologia, farmacoterapia, epidemiologia e bioterrorismo. (ROBLEGGA et al, 2019)

Saliva na íntegra é uma mistura das secreções das glândulas salivares maiores e menores, transudações da mucosa oral, fluido gengival, soro e derivados do sangue provenientes das feridas orais, descamação epitelial das células da mucosa, secreções brônquicas e nasais expectoradas, bactérias e produtos bacterianos, vírus e fungos, assim como outros componentes celulares e restos de alimentos. Logo, se tratando de um fluido complexo contendo uma biblioteca inteira de hormônios, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citocinas. (MALATHI et al ,2014)

Desde o princípio a saliva foi considerada um bom marcador da saúde bucal, porém com os avanços tecnológicos ela passou a ser comparada com os níveis séricos, e considerada como um ótimo marcador da saúde geral de um indivíduo. (Streckfus et al, 2002; Malathi et al, 2014) As principais áreas da medicina que fazem uso da saliva como meio de diagnóstico e controle da evolução das patologias são o estudo de doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, doenças endócrinas, doenças infecciosas, doenças oncológicas e doenças renais, assim como, o uso de amostras salivares tem se mostrado muito útil na avaliação do uso de drogas e na psiquiatria. (STRECKFUS et al, 2002; MALATHI et al, 2014)

Estes diagnósticos são feitos por meio de vários métodos, entre eles os mais usados são a cromatografia líquida, espectrometria de massa, e ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA), porém estes métodos em sua maioria consomem tempo e requerem uma grande amostra para que possam ser eficientes, no entanto a espectroscopia Raman oferece uma solução elegante para estes problemas sem depreciar a precisão dos resultados. (XIAOZHOU et al, 2012)

A saliva é constituída de 99,5 % água, 0,2 % de sais inorgânicos , 0,2 % enzimas e proteínas e 0,3%. Elas são produzidas e sintetizadas pelas glândulas salivares, estas que são innervadas pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático tendo um caráter autonômico não voluntário. As principais glândulas produtoras de saliva são as parótidas as submandibulares e as sublinguais. A natureza deste fluido pode variar entre mucosa, serosa ou mista. A saliva serosa tem características aquosas enquanto a saliva mucosa tem maior densidade e características mais viscosas, estas alterações estão diretamente ligadas ao sistema nervoso autônomo. As glândulas salivares são constituídas basicamente de dois tipos de células, os ácinos mucosos e os ácinos serosos, este que se ligam à cavidade oral através de um sistema de canais chamados de ductos estriados que coletam a saliva e a transportam para a boca. (CARPENTER, 2013)

As glândulas parótidas são as maiores e secretam saliva serosa, por serem as maiores pode colaborar com 20 a 60% do total da produção de saliva são ricas em amilase, sulfomucinas e sialomucinas. (CARPENTER, 2013)

já as glândulas salivares submandibulares são os sucessores em tamanho e produzem a saliva mucosa que consiste principalmente de glicoproteínas, cistatinas sulfatadas e fatores de crescimento epidérmicos e neurais elas contribuem com 0 a 65% do volume total de saliva, já as glândulas sublinguais produzem saliva mucosa é composta principalmente por mucinas e altos níveis de lisozimas, e contribui 7 a 8% para o fluxo total. (CARPENTER, 2013)

O PH normal da saliva é de 6,0 a 7,0, mostrando uma capacidade tampão de 3,1 a 6,0 mmol H<sup>+</sup>/L. Os fatores que afetam a taxa de fluxo de produção da mesma incluem o grau de hidratação, a posição do corpo (em pé ou deitado), ou o ciclo circadiano e ritmo circannual. (DAWES et al , 1974)

O fluxo de produção da saliva depende da sua demanda, logo vários valores são demonstrados na literatura medidas muito individualizadas. Em suma a taxa de produção varia entre 0,3 a 0,4 ml/min, com uma osmolaridade variando de 50 a 70 mosmol/kg. o pH normal é de 6,0 a 7,0 (TEUBL, 2018)

Fatores que influenciam na taxa de produção de saliva são hidratação, a posição do corpo (em pé ou deitado), ou o ciclo circadiano e ritmo circannual. (DAWES et al ,1974. DAWES, 1987)

Uma vez que a taxa de fluxo aumenta devido à estimulação mastigatória, gustativa ou farmacológica, o nível máximo de saliva chega até 7 mL/min. Com isso, os níveis de eletrólitos salivares de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>++</sup> e HCO<sub>3</sub> aumentam, no entanto os níveis de K<sup>+</sup> diminuem. ( THAYSEN et al, 1954)

As principais proteínas presentes na saliva são mucoglicoproteínas (mucinas) e outras proteínas, como proteínas ricas em prolina, aglutininas, histatinas, cistatinas, lisozimas e glicoproteínas. amilase é a proteína mais abundante na saliva, secretada por todas as glândulas e converte polissacarídeos não solúveis em unidades solúveis. As mucinas salivares são uma família de grandes polímeros de glicoproteínas que previnem a desidratação do revestimento interno. as mucinas apresentam uma estrutura proteica rica em aminoácidos serina, prolina e treonina. (ROBLEGGA et al, 2019)

## 4. ESPECTROSCOPIA RAMAN

### 4.1 O EFEITO RAMAN

O efeito Raman é o resultado entre a troca de energia entre uma molécula e uma luz incidente na mesma. Quando uma substância é atingida pela luz, estes fótons podem ser espalhados ou absorvidos por esta substância, a maior parte da luz espalhada deve ter a mesma assinatura física da luz incidente, ou seja seu comprimento de onda, porém uma pequena fração da luz incidente pode interagir com a substância fazendo com que as moléculas da substância entrem em vibração devido a energia da luz incidente. Com esta reação a frequência da luz emitida é alterada pela vibração das moléculas que absorveram energia se tornando proporcional a cada tipo de vibração. (HANLON et al, 2000)

Do ponto de vista do nível de energia, o processo de espalhamento Raman pode ser visto como a transição de uma molécula do seu estado fundamental para um estado vibracional excitado, acompanhado pela absorção simultânea de um fóton incidente e posteriormente a emissão de um fóton de menor energia de volta ao ambiente, este processo pode ser chamado de espalhamento Raman. (HANLON et al, 2000)

Esta característica pode ser muito útil caso estas luzes emitidas, de características diferentes da luz original, sejam captadas e analisadas por um espectrômetro, e com isso exibida como um espectro e medida em valores quantitativos, quando sua intensidade é medida de acordo com sua mudança de frequência. Uma vez que cada tipo de molécula gera um padrão único de frequência, o espalhamento Raman de um material terá uma série de picos que corresponderá a uma série muito particular de bandas deslocadas unicamente por aquelas moléculas. Este espectro produzido tem características únicas daquela substância e a esta medição específica chamamos espectroscopia Raman, esta técnica por tamanha coerência é muitas vezes chamada de impressão digital da substância. (HANLON et al ,2000)

Uma das técnicas mais úteis da espectroscopia faz uso de laser de comprimento de onda no infravermelho próximo e sensores semicondutores de CCD, a evolução destes equipamentos gerou um expressivo ganho na especificidade dos sinais captados e diminuição na fluorescência e ruído estes muito mais presentes em comprimentos de onda dentro do espectro visível e sensores não refrigerados. Outra maneira muito comum de evitar a fluorescência é subtrair um polinômio de baixa ordem ajustado ao espectro bruto. Outra técnica padrão é transformar o espectro de Fourier, descartar os componentes de baixa frequência e, em seguida, retornar os componentes restantes de alta frequência Raman. (HANLON et al, 2000)

Apesar da espectroscopia Raman ser usada na química industrial o avanço de materiais e técnicas de processamento tem contribuído para o uso cada vez mais frequente desta técnica na medicina. As fontes de laser de diodo compacto podem fornecer excitação de linha estreita estável em uma faixa de comprimentos de onda no infravermelho próximo. Os detectores CCD de alta eficiência quântica e baixo ruído permitem uma rápida aquisição de dados multicanal. Os componentes ópticos holográficos tornaram-se recursos integrais dos sistemas Raman atuais. Os filtros de entalhe holográfico podem atenuar a luz de excitação por um fator de um milhão e, assim, reduzir a luz difusa e o ruído de disparo associado. Os filtros de linha de laser holográfico transmitem o comprimento de onda de excitação do laser em uma banda estreita com eficiência de 85 a 95%, enquanto bloqueiam a radiação laser indesejada, e as grades de transmissão holográfica permitem um design espectrógrafo compacto e de alto rendimento. (HANLON et al ,2000)

Instrumentos Raman construídos para pesquisa de laboratório, com provisão para comprimentos de onda de excitação e detecção variáveis e a capacidade de coletar espectros de altíssima qualidade, são importantes para estudos de desenvolvimento de aplicações. Tais sistemas podem ser usados para otimizar comprimentos de onda de excitação para um tipo de tecido específico e estabelecer limites aceitáveis e tempos de aquisição de dados. Os dados *in vitro* obtidos com um sistema de laboratório podem ser usados para desenvolver e testar modelos e algoritmos analíticos. Um sistema de laboratório que incorpora a capacidade de microscopia Raman confocal pode adquirir espectros de componentes morfológicos individuais do tecido para uso em modelagem. Por outro lado, os sistemas Raman construídos para estudos clínicos têm requisitos totalmente diferentes. Eles devem ser móveis, e trabalhar em um comprimento de onda de excitação único, e serem capazes de coletar espectros por meio de fibras ópticas em poucos segundos a fim de a minimizar artefatos de movimento e devem estar em conformidade com as diretrizes de segurança de hospitais e clínicas. (HANLON et al, 2000)

## **3.2 COMPONENTES DE UM SISTEMA RAMAN**

### **3.2.1 Detetor**

Uma das peças mais importantes na montagem de um equipamento de medição Raman é o (CCD), “charge-coupled device”. Este dispositivo funciona como um detector espectroscópico de elementos fotossensíveis ou pixels dispostos em linhas horizontais e colunas verticais, uma configuração conhecida como matriz de plano focal (FPA). Em aplicações

espectroscópicas, a direção espectral ou comprimento de onda corresponde às linhas horizontais e os pixels da coluna são geralmente somados verticalmente, fornecendo intensidade em cada comprimento de onda. (HANLON et al, 2000)

Estes equipamentos são produzidos com placas monolíticas de silício, normalmente de dimensões próximas à  $1024 \times 256$  pixels, cada um com  $25 \mu\text{m}$  de lado, cobrindo assim uma área de cerca de  $25 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ . Estas dimensões operam em taxas de leitura típicas de 50 kHz chegando a uma eficiências de 90% no infravermelho próximo. (HANLON et al, 2000)

### **3.2.2 Filtros ópticos**

Devido a luz espalhada no comprimento de onda de excitação do laser ser tipicamente um milhão de vezes mais intensa que o espectro Raman certos equipamentos foram acoplados afim de retirar a maior parte do espectro de onda do laser emissor, o advento de melhores filtros para este proposito eliminou a necessidade de espectrômetros de varredura com vários estágios o que facilitou o processo, sendo fundamental para permitir a aquisição rápida de dados espectrais usando as novas tecnologias. Os filtros de entalhe holográfico podem ter uma largura de banda de bloqueio muito acentuada no comprimento de onda de excitação, com taxas de contraste superiores a um milhão, enquanto transmitem 90% da luz com uma linha de base relativamente plana acima e abaixo do comprimento de onda de excitação. (HANLON et al, 2000)

### **3.2.3 Espectrógrafos**

São equipamentos que através do CCD recebem e interpretam o sinal permitem a aquisição multicanal de toda a faixa da região de impressão digital Raman  $400\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$  no menor tempo possível. (HANLON et al, 2000)

### **3.2.4 Laser**

O laser é o principal meio de excitação das moléculas que através de um feixe de fótons colimados bombardeia o tecido biológico afim de produzir a vibração das moléculas. os principais meios laser usados são Arseneto de índio e gálio (InGaAs), germânio (Ge) e antimoneto de índio (InSb), (HANLON et al, 2000).

### 3.3 ESTUDOS RAMAN NA SALIVA

O uso da espectroscopia Raman associado a biofluidos tem aumentado à medida que os equipamentos se tornam mais acessíveis, somado a isso a facilidade de se usar biofluidos de fácil aquisição como a saliva e o volume diminuto necessário para a análise Raman, tem aumentado ainda mais a atratividade para o uso destes equipamentos.

Um estudo particularmente interessante se preocupou em determinar o sexo dos voluntários através da espectroscopia Raman pensando em especial na medicina forense onde em casos específicos de cenas de crime amostras de saliva podem ser usadas como evidências, a espectroscopia pode ser de fundamental interesse caso dados de DNA não sejam identificados em um banco de dados, apresentando uma assertividade de 44 em 48 amostras ou seja, com uma eficiência de 92% em identificar o sexo dos voluntários usando apenas a saliva, os autores ressaltam ainda que o fato da espectroscopia Raman não destruir as amostras faz desta ferramenta de fundamental importância. (MURO et al, 2016)

Ouros autores evidenciaram a eficiência do uso da espectroscopia Raman na identificação da periodontite em 5 pacientes quando comparados com pacientes saudáveis, sugerindo que a espectroscopia Raman pode ser de bastante interesse para a prevenção e controle da saúde bucal, sendo as principais diferenças nos picos de 1155 e 1525  $\text{cm}^{-1}$  referentes a carotenoides presente em maior quantidade em pessoas com esta enfermidade. (GONCHUKOV et al, 2012)

Estudos tem sugerido com certa assertividade o diagnóstico de câncer de pulmão através de estudos de espectroscopia Raman da saliva, aparentemente a assertividade encontrada pelos pesquisadores foi de 80% se mostrando como uma ferramenta fundamental na identificação precoce de tumores pulmonares que podem ser detectados por diminutas amostras de saliva contendo baixas quantidades de proteínas e ácidos nucleicos em picos de 622  $\text{cm}^{-1}$  identificados como fenilamina e outras proteínas. (LI et al, 2012)

Outro estudo fazendo uso desta modalidade de espectroscopia na saliva conseguiu detectar a presença de metanfetamina na saliva de voluntários identificando através da fermenta de análise de componente principal (PCA), a presença mesmo que diminuta foi encontrada, demonstrando sua eficiência e velocidade de resposta muito maior do que testes de laboratório que demoram muito mais do que alguns minutos como nesta pesquisa. (ANDREOU ET AL 2013) Outro estudo se mostrou eficiente em detectar a cocaína na saliva de voluntários. (INSCORE et al, 2011)

Além disso, amostras de saliva analisadas com espectroscopia Raman também são utilizadas na identificação de vírus com uma assertividade de 93% segundo os autores, além de apresentarem resultados em minutos, considerados quase que imediatos. Demonstrando que este tipo de avaliação pode ser de fundamental importância para a análise de vírus em cenários como o da pandemia de covi-19. (DESAI et al, 2020)

## 5. FERRAMENTA ESTATÍSTICA

### 4.1 ANÁLISE DO COMPONENTE PRINCIPAL

A análise do componente principal é uma ferramenta que permite extrair volume de dados um conjunto de variáveis que simplificam sua interpretação, em grupos chamados de componentes principais, estes dados são encontrados por meio da variância entre os dados, gerando duas novas variáveis que são os componentes principais e escores ou pontuações. Esta pontuação indica a intensidade de cada componente principal nos dados. (BROWN e HANLON, 2000).

É comum que este tipo de discriminação seja usado para procedimentos que produzem um volume muito grande de dados como é o caso da espectroscopia Raman, estudos que fazem uso desta modalidade de espectroscopia usam a PCA como ferramenta discriminatória com frequência. (DANIEL et al 2023; LIMA et al 2022; GUIMARÃES et al 2022; MELLITO et al 2022)

Os principais objetivos de uma análise dos componentes principais são:

Extrair as informações mais importantes de um conjunto de dados, especialmente interessantes quando há um volume muito grande de dados. Comprimir o volume de dados mantendo apenas as informações mais importantes, simplificar a descrição do conjunto de dados. Analisar a estrutura das observações e das variáveis. (ABDI e WILIAMS, 2010)

Para atingir esses objetivos, esta análise calcula novas variáveis chamadas de componentes principais que são obtidas como combinações lineares das variáveis originais. Sendo o primeiro componente principal necessário para orientar os componentes restantes, sendo este, responsável pela maior inercia de dados, o segundo componente é calculado sob a restrição de ser ortogonal ao primeiro componente e ter a maior inércia possível. Os outros componentes são calculados da mesma forma. (ABDI E WILIAMS, 2010)

Os valores dessas novas variáveis para as observações são chamados de escores fatoriais, e esses escores fatoriais podem ser interpretados geometricamente como as projeções das observações sobre os componentes principais. (ABDI E WILIAMS, 2010)

Esta técnica se mostra muito versátil, além de uma antiga e continua técnica de análise multivariada de dados sendo extremamente popular em pesquisas com um grande volume de dados. (ABDI E WILIAMS, 2010)

O teste estatístico de Mann-Whitney, também conhecido como teste U de Mann-Whitney ou teste U de Wilcoxon, foi utilizado, este que é um método não paramétrico utilizado

para comparar duas amostras independentes e determinar se elas provêm de populações diferentes. É amplamente utilizado quando os dados não seguem uma distribuição normal ou quando as suposições dos testes paramétricos não são atendidas. (GIBBONS & CHAKRABORTI, 2010).

No teste de Mann-Whitney, as observações das duas amostras são combinadas e classificadas em ordem crescente, ignorando-se a origem das amostras. Em seguida, é calculada a estatística U, que representa o número total de vezes em que uma observação de uma amostra é maior do que uma observação da outra amostra. A hipótese nula assume que as duas amostras são independentes e têm a mesma distribuição subjacente, enquanto a hipótese alternativa sugere que as amostras têm distribuições diferentes. (GIBBONS & CHAKRABORTI, 2010).

A estatística U é comparada com os valores críticos de uma tabela de distribuição de Mann-Whitney para determinar se a diferença observada entre as amostras é estatisticamente significativa. Se o valor calculado de U estiver abaixo do valor crítico, isso sugere que há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula e concluir que as amostras têm distribuições diferentes. Caso contrário, não há evidências significativas para rejeitar a hipótese nula, o que implica que as amostras podem ser consideradas como originadas da mesma população. (GIBBONS & CHAKRABORTI, 2010).

## 6. MATERIAIS E METODOS

Neste estudo de ensaio clínico simples antes e depois, 20 voluntários sadios e assintomáticos foram convidados a participar onde o critério de inclusão foi de que os indivíduos possuíssem mais de 18 anos, aceitassem se submeter a todas as coletas e a uma consulta de quiropraxia, os critérios de exclusão foram indivíduos com doenças já conhecidas ou que apresentassem indícios de doenças e contraindicações durante a avaliação quiroprática no dia da consulta, assim como indivíduos que haviam passado por manipulações vertebrais a menos de 15 dias. Os métodos da pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética da Plataforma Brasil com a identificação CAAE: 56270322.8.0000.5492, assim como todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido a respeito dos procedimentos relativos a esta pesquisa.

Assim, foram organizadas coletas de saliva em quatro fases, três anteriores ao procedimento quiroprático, a fim de avaliar os volumes usuais dos componentes químicos presentes na saliva destes, e uma quarta coleta 24 horas após o procedimento quiroprático, afim de avaliar as possíveis mudanças químicas decorrentes deste procedimento na saliva dos voluntários. Todas as coletas foram realizadas entre as 7:30 e 10:00 horas e não foi solicitado aos voluntários que se apresentassem em jejum.

Tabela 1– Calendário de procedimentos e coletas de saliva realizados na pesquisa.

Amostra I	Amostra II	Amostra III	Amostra IV
dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 15
	Coleta		Coleta
Coleta saliva.	saliva.	Coleta saliva.	de saliva.
Assinatura do		Procedimento	
termo de		quiroprático.	
consentimento.			

Para as coletas foi solicitado que os voluntários colocassem em torno de 5 a 10 ml de saliva em tubos Falcon de 50 ml com tampa. Logo após serem coletados, os tubos foram devidamente fechados e imediatamente congelados em refrigerador a -20° C, estas amostras foram mantidas congeladas por todo o período de coleta e por mais 20 dias decorrentes

totalizando 35 dias. Após este período todas as amostras foram descongeladas simultaneamente em temperatura ambiente no dia da realização da investigação no laboratório de espectroscopia da universidade Anhembi Morumbi localizado no Parque Tecnológico de São José dos Campos localizado na Estrada Dr. Altino Bondensan, 500 - Eugênio de Melo, São José dos Campos, Sp.

Os espectros foram obtidos por meio de uma sonda Raman conectada a um espectrômetro Raman. O espectrômetro (Lambda Solutions, MA, modelo P-1 Raman, E.U.A.) é composto por um laser de diodo (830 nm) acoplado a uma sonda Raman (Lambda Solutions, MA, modelo Vector Probe, E.U.A.) que é usado para iluminar a amostra e coletar a luz espalhada. A sonda está conectada a um espectrógrafo com câmera de dispositivo acoplado a carga resfriada por resfriamento Peltier, profundamente esgotada / retroiluminada ( $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), que coleta o espectro Raman de alta resolução da amostra na região da impressão digital ( $400\text{ a }1800\text{ cm}^{-1}$ ). A potência do laser foi ajustada a 300 mW e o tempo de integração / acumulação para coletar o sinal Raman foi definido para 90 s, divididos em três séries de 30 s afim de realizar treplicas das coletas de cada substancia.

O procedimento quiroprático foi realizado através de uma avaliação seguida pelo tratamento quiroprático eleito por um quiropraxista graduado com mais de 5 anos de experiencia. Todo o tratamento foi realizado através de manipulações vertebrais e pélvicas pertencentes a técnica diversificada. Uma vez que se tratava de um atendimento real, cada voluntario foi ajustado em segmentos diversos dependendo da demanda clínica. Esta ação se explica uma vez que o intuito da pesquisa é investigar a repercussão do atendimento quiroprático e não um procedimento em específico.

É de relevância que todos os voluntários eram alunos do curso de quiropraxia e já haviam passado por procedimentos quiropráticos previamente.

Após coletados, os dados foram processados fazendo uso do software MATLAB (versão R2021b, The MathWorks Inc., MA, EUA) para remover o fundo de emissão correspondente ao espectro correspondente à água destilada. Um algoritmo de ajuste de curva polinomial foi aplicado a cada espectro Raman e a função polinomial calculada que melhor se ajustou ao fundo de emissão foi subtraída. Em seguida, o espectro coletado da água foi subtraído de cada espectro de saliva. O objetivo desta análise foi identificar os componentes espectrais que são exclusivos da saliva, removendo assim interferências causadas pela presença de água. Essa técnica é útil porque a presença de água nesses fluidos pode interferir na identificação de componentes específicos.

Os dados espectrais foram então submetidos à análise de componentes principais (PCA) para revelar as diferenças bioquímicas entre os grupos antes e depois do tratamento

quioprático. O software Chemoface (versão 1.65, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil) foi utilizado para extrair as variáveis do PCA: os escores dos componentes principais (autovetores) e os carregamentos (intensidade de cada autovetor no espectro original).

Este processo foi realizado com o objetivo de identificar padrões importantes dentro de um grande volume de dados que possam estar relacionados às diferenças na constituição bioquímica das amostras biológicas, a técnica de PCA realiza uma transformação linear que encontra um novo sistema de coordenadas ortogonais para o conjunto de dados, de modo que a maior variância em qualquer projeção dos dados apareça no primeiro eixo (autovetor) PC1, a segunda variância no segundo eixo PC2, e assim por diante. Os últimos PCs trazem apenas ruído. Esses autovetores são semelhantes a espectros Raman e são capazes de identificar a composição das substâncias; os carregamentos são capazes de identificar a quantidade relativa dessas substâncias nas amostras.

## 7. RESULTADOS

Foram avaliados 20 voluntários em quatro dias diferentes, Amostra I, II, III e IV, como os resultados foram pareados, voluntários que faltassem a uma das coletas eram automaticamente extraídos do estudo. Três voluntários foram excluídos do estudo devido à falta em uma das coletas, portanto não foram utilizados nos cálculos.

Logo, sobrando 17 voluntários 8 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, com uma média de idade de 32.4 anos entre todos os voluntários sendo o grupo M 32 e F 33, e uma mediana de idade de 23 anos sendo M 22 e F 30, caracterizando uma amostra de voluntários equilibrada entre os sexos, porém predominantemente jovem, mas com alguns voluntários ultrapassando os 50 anos, de ambos os sexos caracterizando uma amostra equilibrada entre os gêneros e porem predominantemente jovem em especial no grupo masculino.

Tabela 2 - Tabela com idade e gênero dos voluntários, demonstrando dados equilibrados entre ambos os gêneros, porém predominantemente jovens em especial no grupo masculino

	FEMININO	MASCULINO
<b>IDADE</b>	21	19
	21	20
	22	21
	25	22
	34	22
	40	23
	45	47
	57	48
		63
<b>TOTAL</b>	8	9
<b>MÉDIA</b>	33	32
<b>MEDIANA</b>	30	22

Portanto, foram consideradas 17 amostras em cada coleta de I até IV totalizando 68 amostras de saliva utilizadas. Uma vez preparadas as amostras foram submetidas a três análises no espectrômetro resultando em 204 espectros processados.

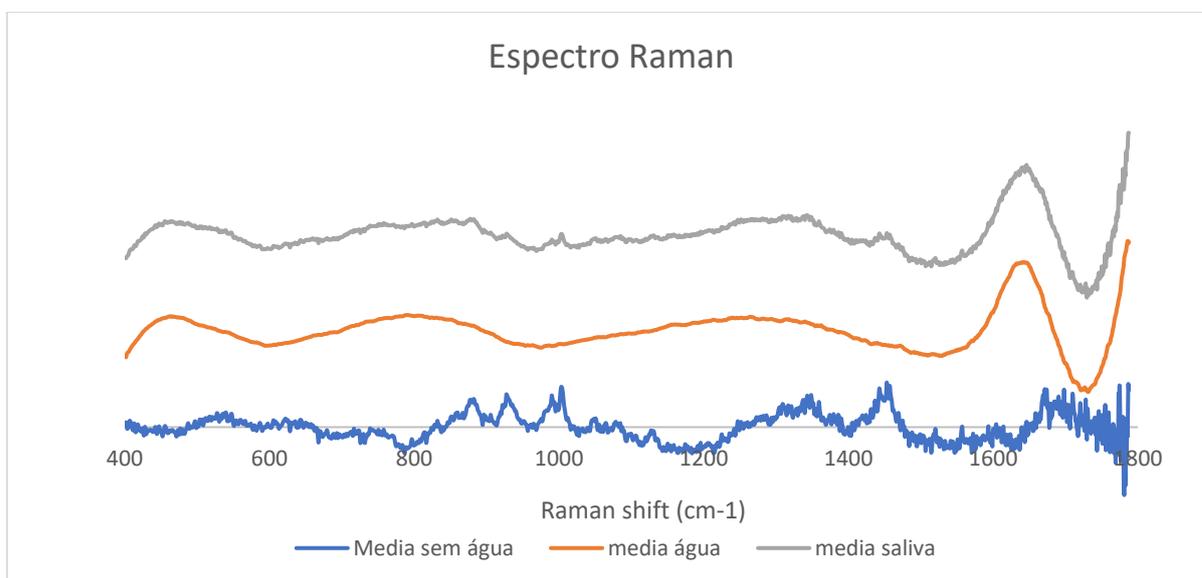


Figura 1. Espalhamento Raman da média das amostras de saliva , espalhamento Raman da média da água destilada e o resultado do espectro da saliva subtraído o espectro da água . O espectro corresponde à média de todas as coletas apresentando um deslocamento vertical afim de melhorar a visualização. (I,II,III e IV).

A fim de esclarecer melhor os picos referentes aos componentes da saliva, o espectro de todas as coletas foi subtraído do espectro da água destilada coletado separadamente, logo o resultado é um espectro sem os ruídos característicos da curva da água com características muito mais visíveis. Como é demonstrado na figura 3.

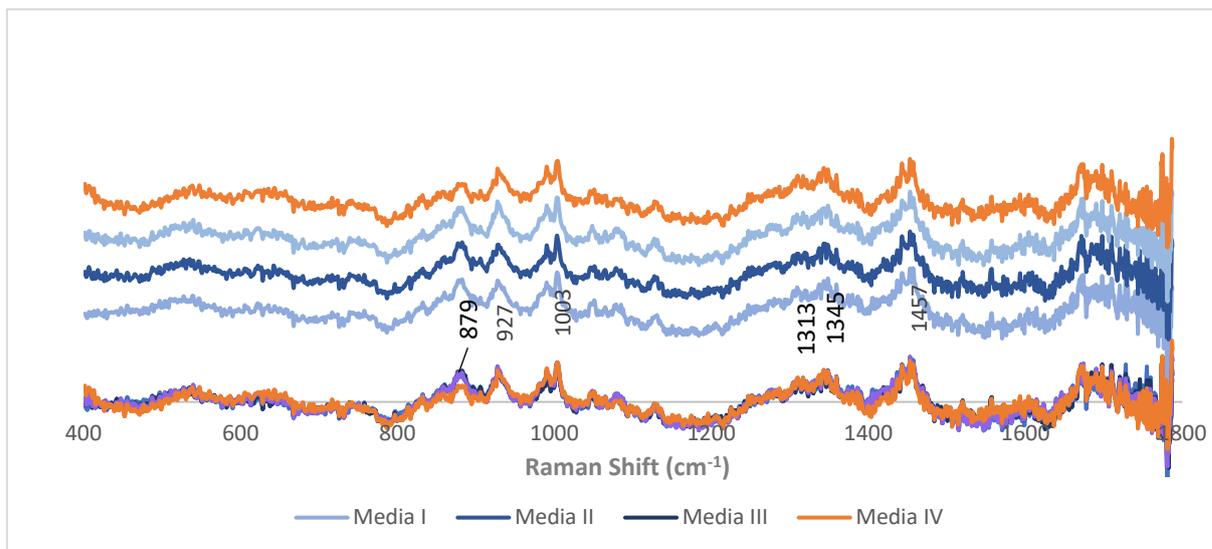


Figura 2. Espectro Raman das quatro amostras de saliva coletadas numeradas de I – IV com o espectro da água subtraído de todas as amostras. Os espectros se apresentam sem grandes discrepâncias evidentes, onde a única exceção é o pico de em  $879\text{ cm}^{-1}$  que se apresenta inferior no grupo pós consulta quiroprática. (IV). Os dados são apresentados com um deslocamento vertical afim de melhorar a visualização.

Quando se tratando das bandas específicas da espectroscopia Raman é necessário salientar que quando usado o espectro Raman para identificar substâncias, deve se atentar que a ligação entre moléculas terá diferentes deslocamentos Raman em grupos diferentes. Por exemplo, a vibração de estiramento (C – C) tem uma mudança Raman de  $1084\text{ cm}^{-1}$  no ácido láurico, mas move-se para  $1092\text{ cm}^{-1}$  no ácido mirístico e  $1099\text{ cm}^{-1}$  em ácido palmítico. Portanto, pode existir certas variações nas atribuições de picos com base na literatura para condições de medição totalmente diferentes. (XIAOZHOU, 2012)

Logo o espectro se apresentou com picos próximos de  $927\text{ cm}^{-1}$  compatíveis com o aminoácido arginina (VIRKLER and LEDNEV, 2010),  $1003\text{ cm}^{-1}$  compatíveis com fenilamina característica da amilase (CARLOMAGNO et al, 2021),  $1313$  até  $1457\text{ cm}^{-1}$  vibração *stretchin* dos grupos metil (CH<sub>3</sub>) e Metileno (CH<sub>2</sub>) incluindo os valores de  $1313$  e  $1345\text{ cm}^{-1}$  (BADEA et al , 2014) no entanto, os picos entre  $873$ ,  $879$  e  $880\text{ cm}^{-1}$  correlacionados ao anel aromático do triptofano e tirosina (KOLJENOVIC EL al, 2004; TALARI et al , 2015; MINAEVA, 2012) apresentaram valores inferiores no grupo de número IV, após o tratamento quiroprático.

Enquanto nas três coletas anteriores I, II e III apresentou valores muito similares sugerindo que houve uma diminuição do volume destes compostos na saliva dos voluntários no grupo IV.

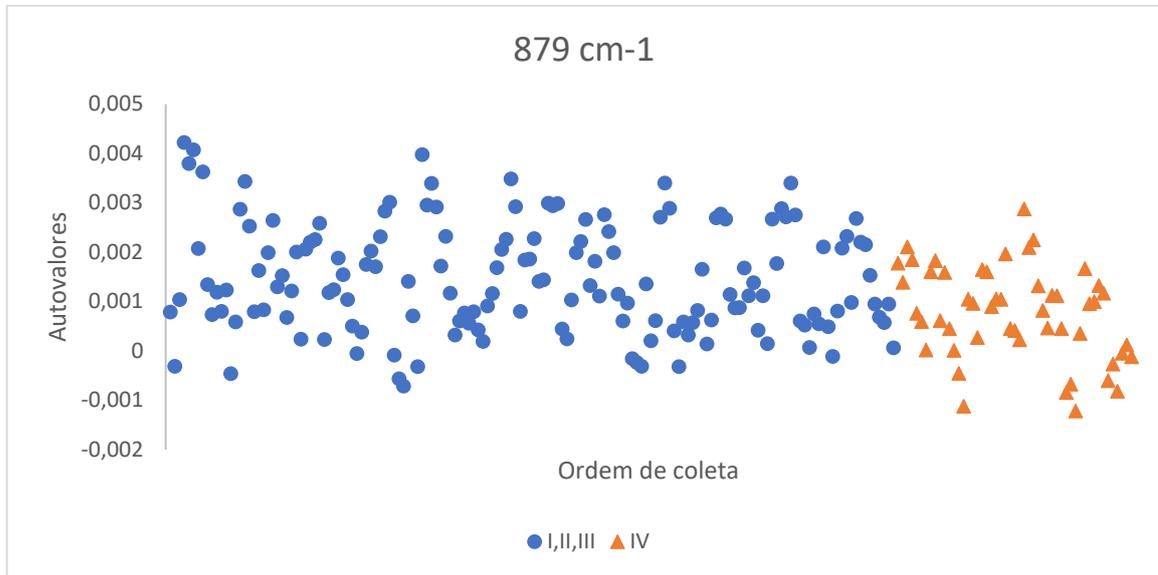


Figura 3. Dispersão dos valores das amostras I,II e III em azul e amostra IV em laranja, para o pico em 879 cm-1, compatível com aminoácido tirosina, em relação à ordem das coletas e autovalores.

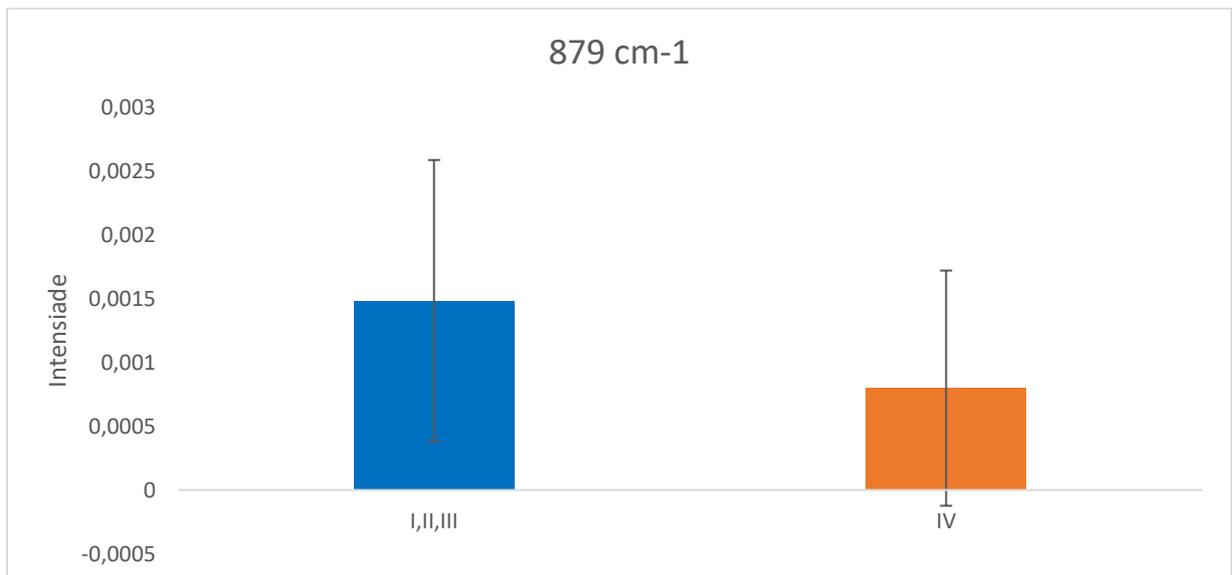


Figura 4. Valores da média e desvio padrão referentes ao pico 879 cm-1, compatível com aminoácido tirosina, sugerindo uma diminuição dos valores no grupo IV quando comparado aos demais I,II e III.

Quando observamos o gráfico de dispersão referente aos valores de todas as amostras, em triplicas, observamos que de fato há uma diferença na distribuição dos valores referentes ao pico  $879\text{ cm}^{-1}$  nas amostras, sugerindo que houve uma mudança na quantidade média deste valor quando comparamos os grupos I, II e III com o grupo IV como observamos na figura 4 e 5.

Em seguida, em uma segunda fase de processamento dos dados, foi realizado uma análise estatística através da ferramenta PCA (Análise do Componente Principal), onde apenas os cinco primeiros componentes foram eleitos, a fim de evitar ruídos nos sinal avaliado. Sendo a amostra de PC1 até PC5 contemplando 58,75% da amostra total de saliva.

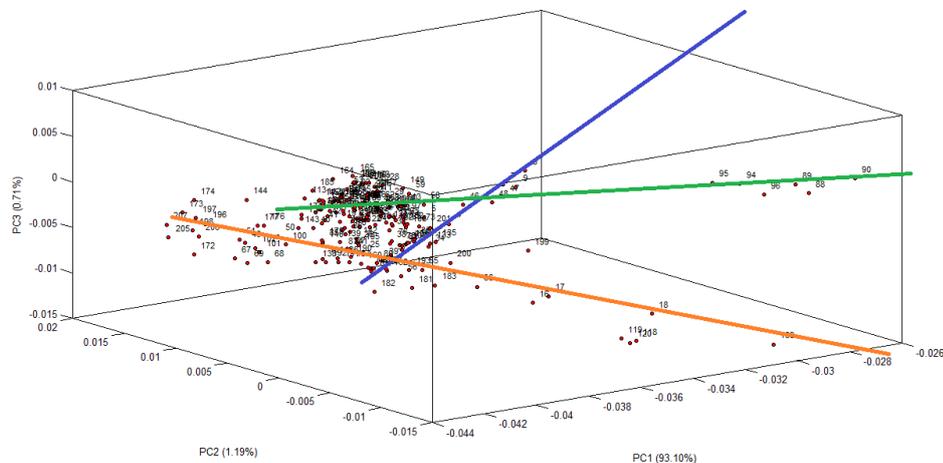


Figura 5. Espalhamento Raman dos três primeiros componentes das amostras de saliva após a análise de componente principal. Esta técnica consiste em uma transformação linear que escolhe um novo sistema de coordenadas ortogonais para o conjunto de dados de maneira que a maior variância por qualquer projeção dos dados aparece no primeiro eixo PC1, a segunda no segundo eixo PC2 e assim sucessivamente.

Os dados foram submetidos a análise do componente principal, fazendo uso do aplicativo Chemoface, a fim de identificar padrões importantes dentro de um grande volume de dados, esta técnica consiste em uma transformação linear que escolhe um novo sistema de coordenadas

ortogonais para o conjunto de dados de maneira que a maior variância por qualquer projeção dos dados aparece no primeiro eixo PC1, a segunda no eixo PC2 e assim sucessivamente.

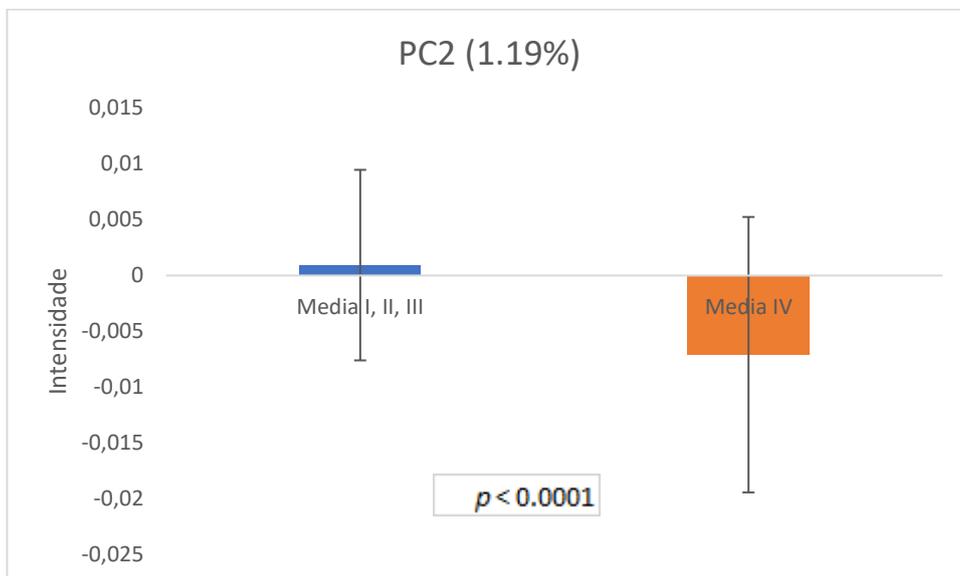
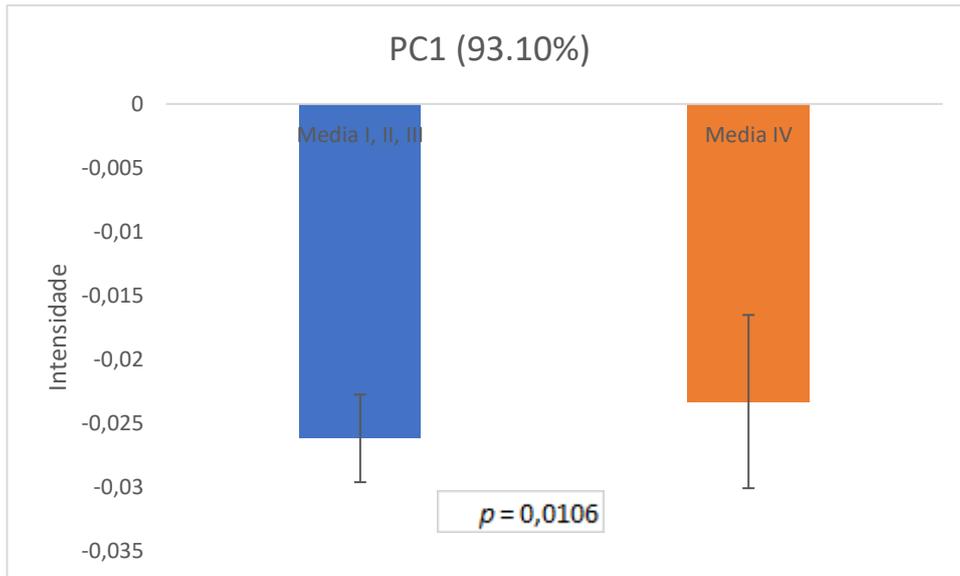
Gerando assim autovetores capazes de identificar os componentes das substâncias e autovalores capazes de identificar o volume destas substâncias nas amostras, além de apresentarem a vantagem de eliminar ruídos desinteressantes ao estudo destas substâncias.

Os cinco primeiros componentes foram eleitos a fim de evitar o acúmulo de ruídos nos demais componentes devido a sua baixa concentração na amostra.

Tabela 3 - Valores referentes à variância e variância acumulada em porcentagem de quanto cada componente principal contribui para a amostra.

	<b>Variância (%)</b>	<b>Variância acumulada (%)</b>
<b>PC1</b>	45.30239471	45.30239471
<b>PC2</b>	7.069391276	52.37178598
<b>PC3</b>	2.651736331	55.02352231
<b>PC4</b>	2.355157135	57.37867945
<b>PC5</b>	1.380333307	58.75901275

Uma vez definido os cinco componentes principais, o autovalor (score plot) de cada componente foi submetido a uma segunda fase de processamento onde os valores das amostras I, II e III foram divididos em um primeiro grupo e a amostra IV em um segundo grupo. Devido à distribuição dos valores não ser gaussiana foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas e não gaussianas.



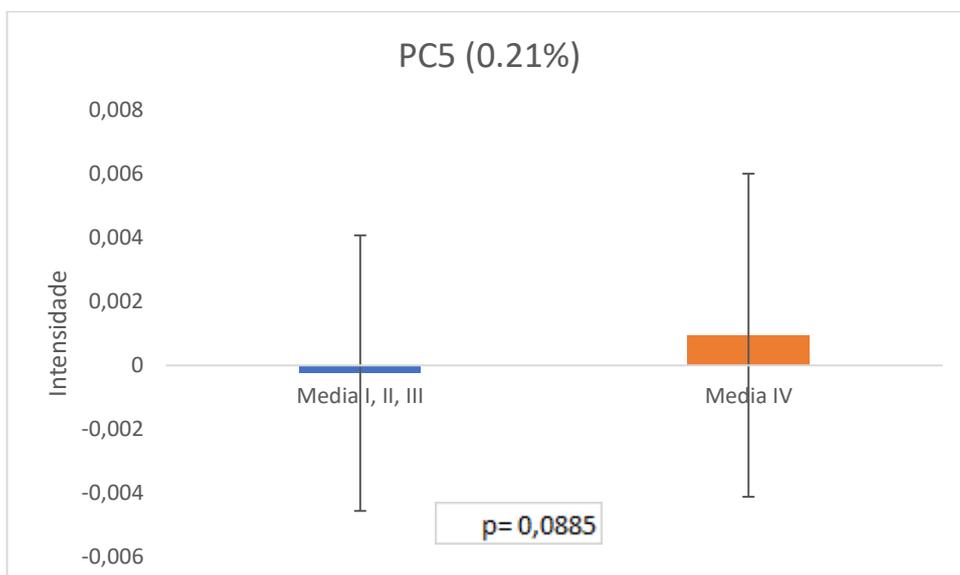
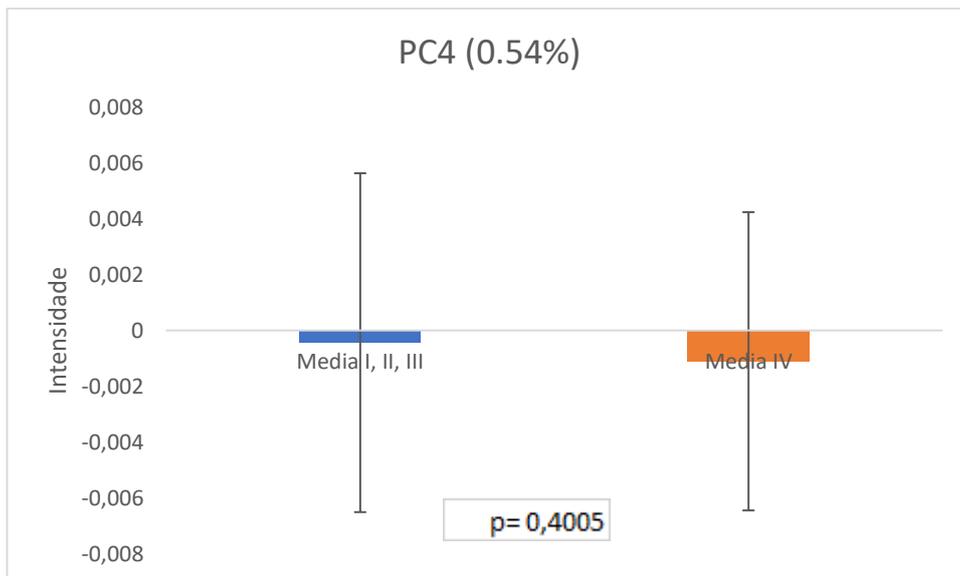
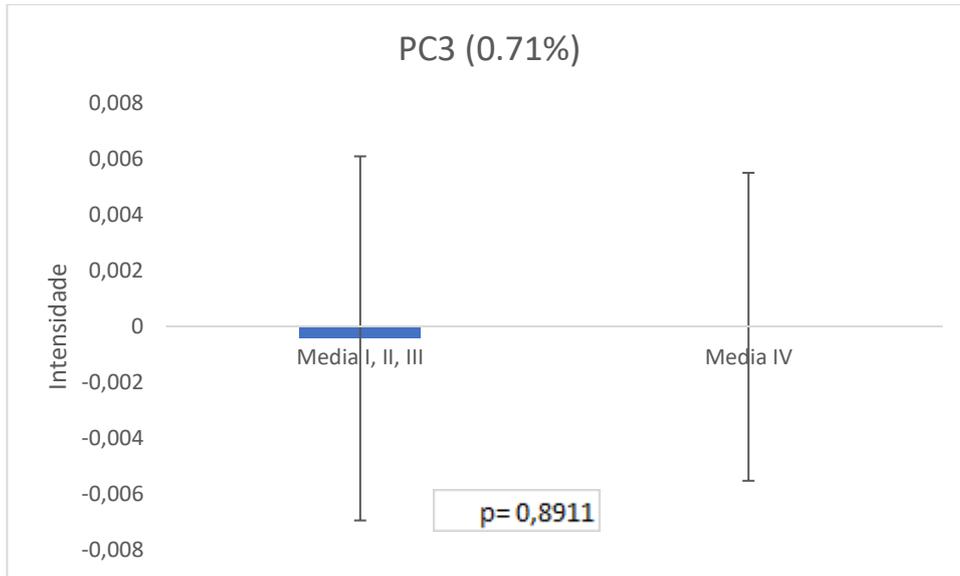


Figura 6. Gráficos de barra da média, desvio padrão e valor  $p$  dos cinco autovalores dos componentes principais comparando as amostras I, II, III na primeira barra com a amostra IV na segunda barra. Com suas respectivas variâncias em relação à amostra.

Logo, os gráficos de barra associados ao  $P$  valor sugerem que há uma diferença com significância entre as amostras das coletas antes do procedimento quiroprático (I,II e III) e após o procedimento quiroprático (IV) nos componentes do PC1 e PC2, porém com uma extrema significância para o PC2.

Tabela 4 - Teste de Mann-Whitney ou valor  $P$  bicaudal dos cinco componentes principais comparando as amostras I, II e III ocorridas antes da consulta quiroprática com a amostra IV após a consulta quiroprática.

I, II, III vs IV	P valor	Significância
<b>PC1</b>	<b>0.0106</b>	<b>significante</b>
<b>PC2</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>Extremamente significativa</b>
<b>PC3</b>	0.8911	Não significativa
<b>PC4</b>	0.4005	Não significativa
<b>PC5</b>	0.0885	Não significativa

Em seguida os autovetores foram plotados a fim de identificar as substâncias presentes no mesmo, sendo que cada espectro corresponde a um grupo de picos, esses autovetores são semelhantes aos espectros Raman e são capazes de identificar a composição das substâncias; os e as intensidades são capazes de identificar a quantidade relativa dessas substâncias nas amostras.

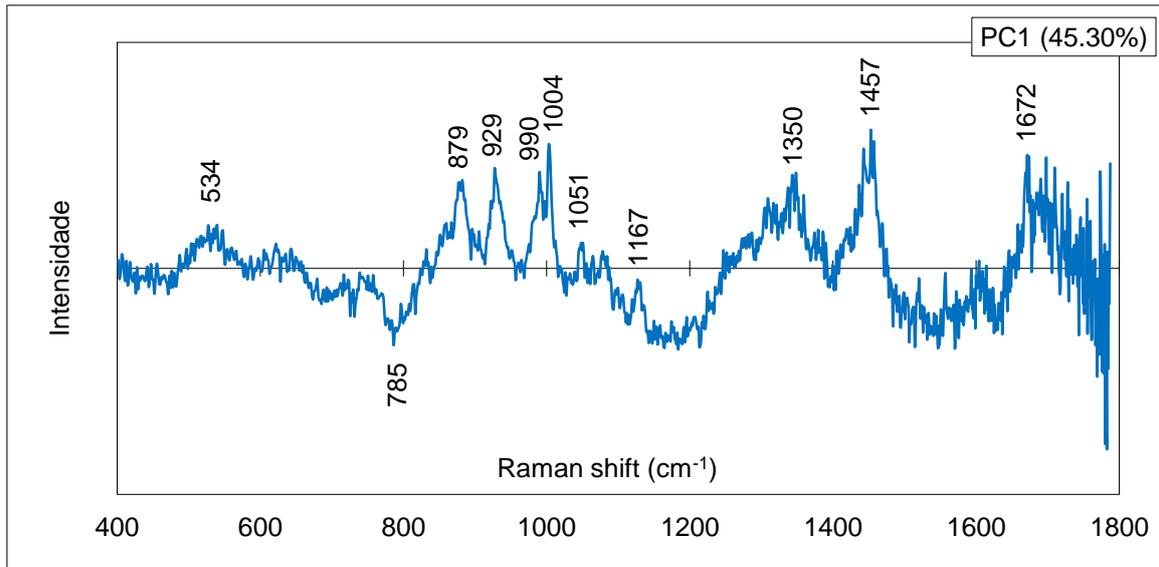


Figura 7. Espalhamento Raman do primeiro componente principal, apresentando características proteicas.

O espectro encontrado no primeiro componente principal PC1 corresponde a 45% de toda amostra tem características proteicas complexas possivelmente provindas de enzimas e é o que melhor representa a amostra como um todo, outros estudos na literatura chegaram a resultados semelhantes. (CALADO et al, 2021)

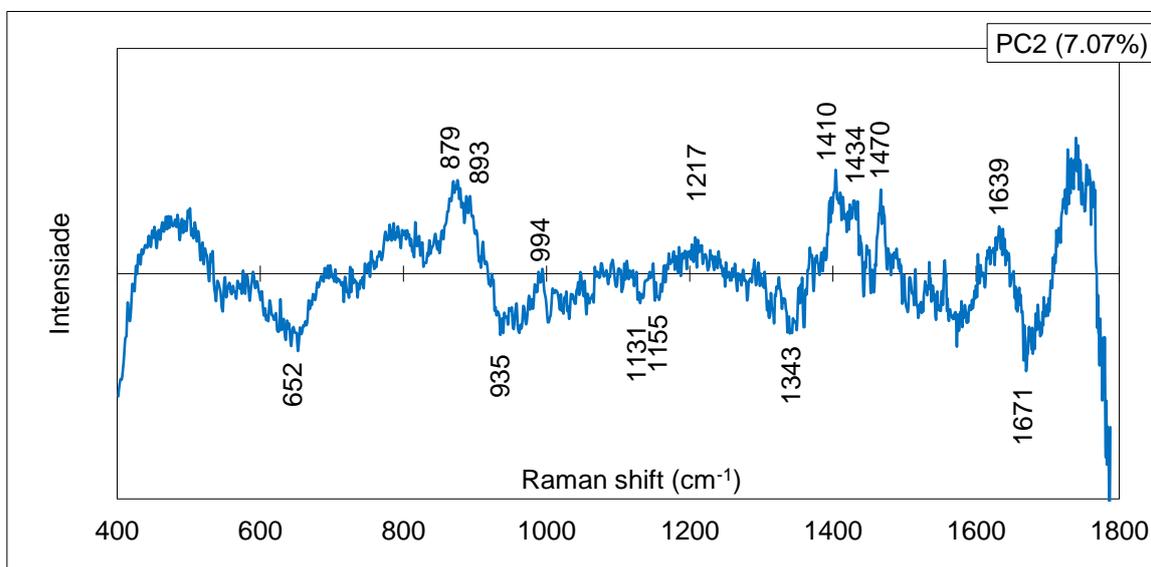


Figura 8. Espalhamento Raman do segundo componente principal. Característico da tirosina.

As características observadas no segundo componente principal (PC2) que representam 7% da variância da amostra, são compatíveis com características da tirosina, que é um aminoácido muito importante responsável por diversas funções no metabolismo humano, incluindo a geração de hormônios como a adrenalina e noradrenalina assim como neurotransmissores como a dopamina (BERRIDGE & WATERHOUSE, 2003; NESTLER & CARLEZON, 2006). Além disso, sabe-se que a tirosina é um componente da saliva (DERRUAU et al, 2020) e da  $\alpha$ -amilase (NAKAJIMA & IMANAKA, 1986). As características com picos em 879 e 893  $\text{cm}^{-1}$  também foram encontradas por Hernandez et al (HERNANDEZ et al, 2016), onde os picos em 826, 848 e 890  $\text{cm}^{-1}$  podem ser combinados em um único pico devido à ressonância de Fermi (HERNANDEZ et al, 2016); o mesmo fenômeno pode ocorrer com os picos em 1639  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser uma combinação dos picos em 1615, 1631 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  (HERNANDEZ et al, 2016). Os picos entre 1410 e 1470  $\text{cm}^{-1}$  também são características da tirosina (HERNANDEZ et al, 2016).

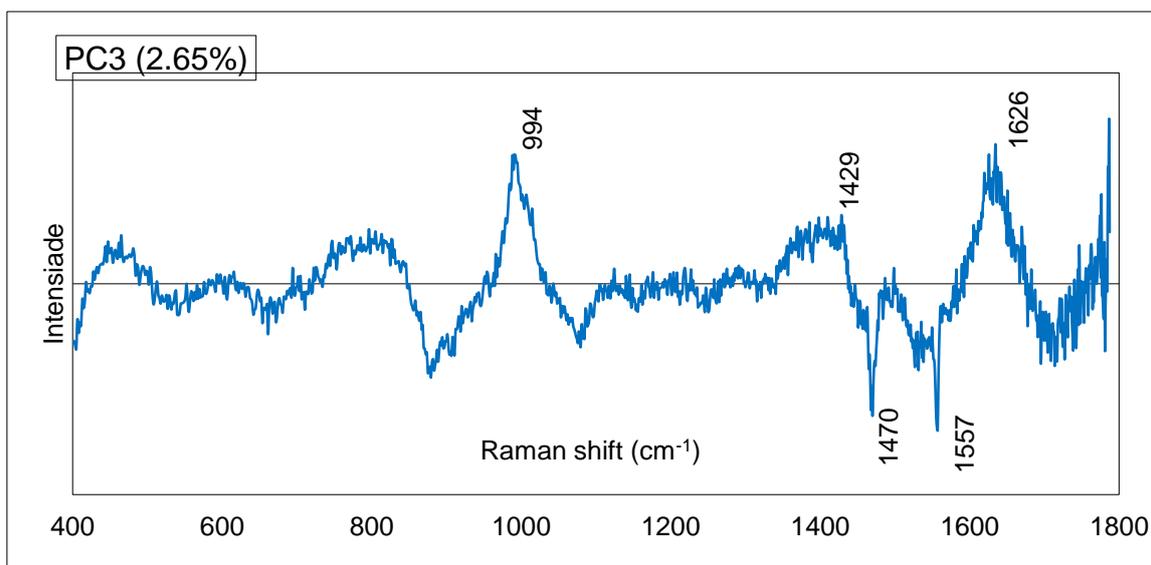


Figura 9. Espalhamento Raman do terceiro componente principal, característico da arginina.

O terceiro componente principal (PC3) apresenta 2,65% da variância da amostra e pode representar as características do aminoácido arginina, com picos próximos a 994, 1382-1429 e 1626  $\text{cm}^{-1}$  (KUMAR & RAI, 2010). Na saliva humana, a arginina é convertida pela enzima arginase em ornitina e ureia. Essa conversão desempenha um papel importante na regulação do pH da boca e na prevenção de cáries dentárias. A arginina é um componente conhecido da saliva (VIRKLER & LEDNEV, 2010; CLAIRE et al, 2016; CARLOMAGNO et al, 2021).

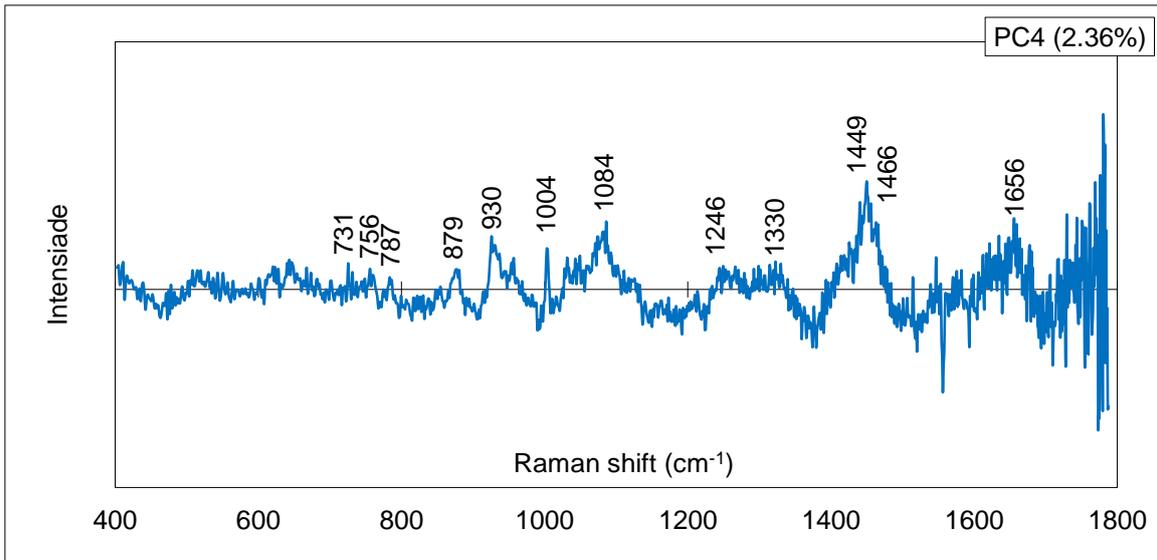


Figura 10. Espalhamento Raman do quarto componente principal, característico de fosfolipídios.

O quarto componente principal (PC4) é responsável por 2,36% da variação da amostra. Características de fosfolipídios são identificadas, provavelmente originadas da membrana celular, onde os principais picos estão em 879, 930, 1084, 1246 a 1330 e 1449  $\text{cm}^{-1}$  (CZAMARA et al, 2015) Exemplos de fosfolipídios que se aproximam dessas características espectrais são fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que possuem cadeias químicas muito semelhantes e, portanto, espectros muito parecidos (CZAMARA et al, 2015).

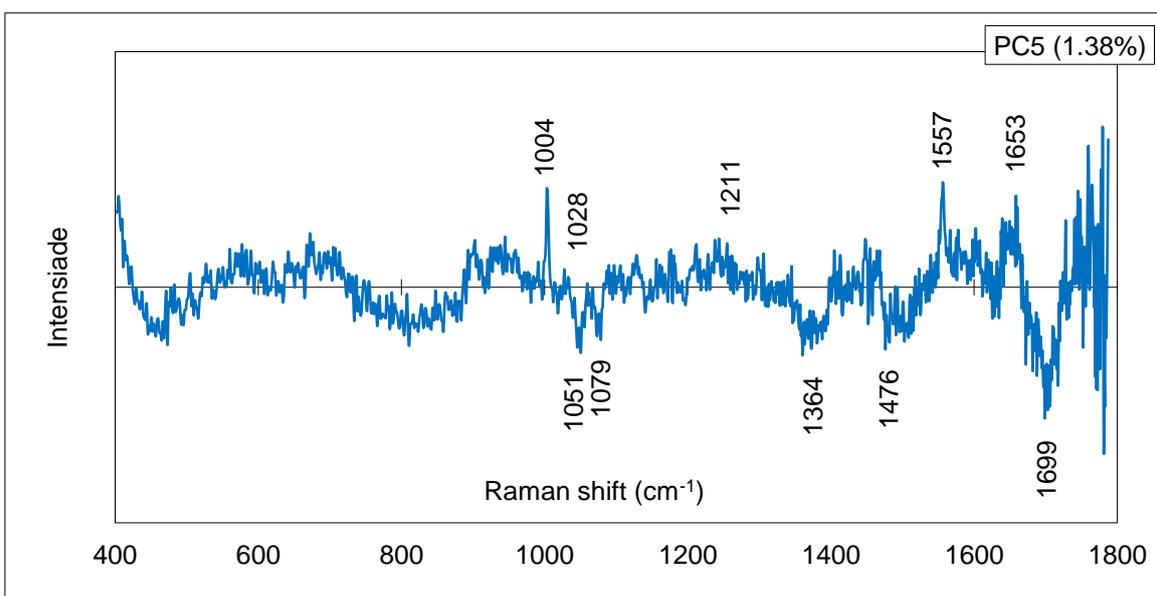


Figura 21. Espalhamento Raman do quinto componente principal, característico de fenilalanina.

O quinto componente principal (PC5 e Score5, Figura 3) corresponde a 1,38% da variação da amostra e as características espectrais podem ser atribuídas à fenilalanina, com picos característicos em  $1004\text{ cm}^{-1}$ . (HERNÁNDEZ et al, 2013; CARLOMAGNO, 2021) A fenilalanina é um aminoácido essencial que contribui para o funcionamento do sistema nervoso, entre outras funções já detectadas na saliva humana (DERRUAU et al, 2020; CARLOMAGNO et al, 2021).

Logo, o componente PC2 relacionado ao aminoácido tirosina apresentou-se extremamente significativo no teste de Mann-Whitney ou valor *P* bicaudal dos cinco componentes principais comparando as amostras I, II, III realizadas antes do procedimento quiroprático quando comparada a amostra IV realizada 24 horas após, com um *P* valor de  $< 0,0001$ ; seguido pelo PC1 com significância de *P* valor 0,0106 os demais componentes não foram significantes sugerindo uma diminuição destes componentes.

## 8. DISCUSSÃO

Dentro de revisão que elaboramos não foi encontrado na literatura outros estudos fazendo menção ao uso da espectroscopia Raman relacionado à investigação de respostas biológicas à quiropraxia, no entanto, esta tecnologia se mostra muito interessante devido ao resultado muito rápido e a não necessidade de envolver vários setores ou o deslocamento das amostras, o uso de amostras de pequenas proporções e a possibilidade de monitoramento de marcadores de saúde geral, como hormônios e substâncias que contribuem para o metaboloma humano, preocupações cada vez mais relevantes do cenário das profissões integrativas na área da saúde.

Quando interpretado o PC1 foi observado que o procedimento quiroprático alterou a composição proteica da saliva, porém os dados mais relevantes nos levam ao segundo componente principal, ao observar o espectro médio da saliva. Observamos uma diminuição do pico  $879\text{ cm}^{-1}$  relacionado ao anel aromático da tirosina, o mesmo mostra-se reduzido após o procedimento quiroprático, sugerindo que esse procedimento possa, de alguma forma, alterar de forma bastante significativa a quantidade dessa substância na fisiologia dos voluntários. Este achado concorda com o volume do segundo componente principal PC2, como demonstrado na figura 7, apresentando, nesta segunda fase da pesquisa, uma diminuição estatisticamente relevante  $p < 0.0001$  como sugere a tabela 4, componente este que apresenta um espectro Raman condizente com o aminoácido tirosina.

Sendo a tirosina um aminoácido extremamente importante na produção de grande soma de substâncias endógenas como a melanina, hormônios de tireoide, mas em especial neurotransmissores como a dopamina e hormônios como norepinefrina e epinefrina (KRONENBERG et al, 2010; BERRIDGE & WATERHOUSE, 2003; NESTLER & CARLEZON, 2006)

A diminuição desse aminoácido é interessante, pois uma vez que este aminoácido possa ser associado à adrenalina e noradrenalina, pode-se criar a hipótese de que o tratamento quiroprático pode intervir nos níveis de hormônios simpáticos, responsáveis pela resposta biológica ao estresse, como é o caso do hormônio cortisol, hormônio este que junto da adrenalina e noradrenalina é produzido na glândula supra renal e tem sido alvo de alguns estudos sugerindo que o tratamento quiroprático de fato é capaz de modular a quantidade destes hormônios em estudos clínicos. (SAMPATH et al, 2017; HUGHES FP, 2020)

A literatura também sugere uma diminuição nos volumes de alguns aminoácidos relacionados à alfa-amilase na saliva após o cuidado quiroprático associando este achado onde

eles relataram uma diminuição da alfa-amilase na saliva de voluntários com dor no pescoço após o tratamento quiroprático, criando a hipótese de que a quantidade de amilase diminuiu como resultado da modulação do sistema nervoso autônomo após o tratamento quiroprático, devido à redução dos níveis de estresse sistêmico. (OGURA et al, 2011).

Uma das hipóteses é a que após certos procedimentos manipulativos de coluna vertebral, o sistema nervoso autônomo seja estimulado através da resposta de hormônios simpáticos como o cortisol, a adrenalina e noradrenalina, e com isso estimule o indivíduo a ter respostas autonômicas em vários órgãos não mecanicamente contíguos à coluna vertebral, explicando assim o mecanismo do reflexo somato-visceral. (PICKAR, 2002)

Alguns autores documentam o aumento dos níveis de cortisol após procedimentos manipulativos da coluna vertebral (MANZANO et al, 2014).

No entanto outros autores relatam uma diminuição do volume do hormônio cortisol pós procedimento quiroprático ou manipulativo. (SAMPATH et al, 2017; HUGHES et al, 2020)

Esta discrepância pode estar relacionada ao estado clínico dos pacientes, onde pacientes enfermos por qualquer patologia podem estar com níveis mais elevados deste hormônio pela própria patologia, e com a diminuição do sintoma apresentar uma diminuição do volume deste hormônio, neste caso este mecanismo de melhora e diminuição deste hormônio poderia ser evidenciado por qualquer outro tratamento que tivesse eficiência em tratar a causa do distúrbio. Neste caso não evidenciando um efeito específico da quiropraxia, e sim, apenas uma evidência de que a quiropraxia também trata a patologia apresentada pelos pacientes estudados.

No entanto, o presente estudo foi realizado com indivíduos saudáveis, que não apresentavam qualquer distúrbio identificado, possibilitando uma identificação de alterações produzidas pelo tratamento quiroprático, sem a interferência de outras patologias. Esta visão possibilita a observação de uma resposta genuína ao procedimento realizado, sugerindo que a resposta somato-visceral também é presente em indivíduos saudáveis.

Outra hipótese plausível é a de que uma única consulta quiroprática possa aumentar os níveis destes hormônios, porém várias consultas ao longo de semanas possa acarretar o desenvolvimento de uma maior tolerância destes hormônios e uma amortização das respostas dos mesmos nas respostas autonômicas.

Os achados presentes nesta pesquisa são interessantes, uma vez que foram coletados 24 horas após o procedimento quiroprático, sugerindo que essas mudanças não são momentâneas e cessam em poucos minutos após o procedimento. Além disso, todos os voluntários eram saudáveis, sem doenças conhecidas, o que sugere que as alterações na fisiologia dos indivíduos

não se devem à melhoria de um sintoma ou patologia prévia, mas sim às repercussões do procedimento quiroprático em indivíduos saudáveis. Isso é explicado pela possibilidade de que os procedimentos de manipulação vertebral ou da coluna estimulem o sistema nervoso autônomo, estimulado pela resposta de hormônios simpáticos como o cortisol, adrenalina e noradrenalina, fazendo com que a fisiologia do indivíduo elicie respostas autonômicas em órgãos não mecanicamente contíguos à coluna vertebral, explicando assim o mecanismo do reflexo somato-visceral (PICKAR JG, 2002)

No entanto, mais pesquisas são necessárias devido ao número restrito de voluntários estudados nesta pesquisa e ausência de grupo controle e/ou placebo e maiores evidências do reflexo somato-visceral são necessárias para a consolidação deste achado na literatura científica.

## 9. CONCLUSÃO

Este estudo contribui para a ideia de que a espectroscopia Raman é útil no cenário clínico, onde profissões de atendimento direto aos clientes podem usar equipamentos de espectroscopia portáteis e softwares específicos afim de monitorar respostas fisiológicas de seus clientes de forma imediata e quantitativa, sem a necessidade de transporte ou o envolvimento de outros setores e outros profissionais de saúde, além de propiciar o conforto para os clientes por utilizar volumes de amostras mínimos.

Outro ponto importante é a contribuição para a compreensão de como a quiropraxia age na fisiologia dos indivíduos em tratamento, os achados corroboram com a hipótese do reflexo somato-visceral, procedimentos que outrora eram considerados de efeito exclusivamente locais podem contribuir para reações nos mais diversos órgãos, como é o caso de os procedimentos realizados na coluna vertebral terem repercutido na composição química da saliva dos voluntários.

Esta pesquisa especificamente demonstrou que pode ocorrer uma relação direta entre a realização dos procedimentos quiropráticos com mudanças químicas da saliva, principalmente relacionadas ao componente proteico da saliva, em especial na diminuição dos volumes do aminoácido tirosina.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. **Principal component analysis**. 2010 John Wiley & Sons, Inc. WIREs Comp Stat 2010 2 433–459. Volume 2, July/August 2010; DOI: 10.1002/wics.101
2. ALI S, HAYEK R, HOLLAND R, ET AL. **Effect of chiropractic treatment on the endocrine and immune system in asthmatic patients**. Proceedings of the 2002 international conference on spinal manipulation; 2002. Sydney, Australia: Department of Biological Sciences, Department of Chiropractic, Macquarie University; 2002.
3. AMF LIMA, CR DANIEL, MTT PACHECO, PL DE BRITO, L SILVEIRA JR **Discrimination of leukemias and non-leukemic cancers in blood serum samples of children and adolescents using a Raman spectral model**. Lasers in Medical Science 38 (1), 2022
4. ANDREOU, C, HOONEJANI, M.R.; BARMIM,R.; MOSKOVITS, M; AND MEINHART, C. D.. **Rapid Detection of Drugs of Abuse in Saliva Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Microfluidics**. ACSNano. VOL. 7 ' NO. 8. 7157–7164 ' 2013
5. AS MELITTO, VEA ARIAS, JY SHIDA, LH GEBRIM, L SILVEIRA JR **Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy**. Lasers in Surgery and Medicine 54 (8), 1143-1156. 2022.
6. BADEA,J . CRISAN, M. FETEA, F. SOCACIU, C. **Characterization of resting versus stimulated saliva fingerprints using Middle-Infrared Spectroscopy assisted by Principal Component Analysis**. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 19, No. 6, 2014
7. BARTOL, K.M. **Osseous manual thrust techniques**. In: **Gatterman MI**., Foundations of chiropractic, 1st ed. St. Louis: Mosby, 1995: 88–104.
8. BERGMANN TF. **Short lever, specific contact articular chiropractic technique**. J Manipulative Physiol Ther 1992;15:591–5.
9. BERRIDGE CW, WATERHOUSE BD. **The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes**. Brain Res Rev. 2003;42(1):33-84.
10. BRODEUR R. **The audible release associated with joint manipulation**. J Manipulative Physiol Ther 1995;18:155–64.
11. BROWN, M **Advances in Infrared and Raman Spectroscopy** .Vol PhysicsBulletin, Volume 27, Number 12

12. CALADO G, BEHL I, BYRNE HJ, LYNG FM. **Raman spectroscopic characterization of non-stimulated and stimulated human whole saliva.** Clin Spectrosc. 2021;3:100010.
13. CAMILA RIBEIRO DANIEL, CR. PACHECO, MTT. LIMA, AM. BRITO, PL. SILVEIRA, L. **Identification of blood cell changes in pediatric oncological patients through Raman spectroscopy.** Journal of Raman Spectroscopy, [S.l.], 27 jul. 2023.
14. CARLOMAGNO C, BERTAZIOLI D, GUALERZI A, PICCIOLINI S, BANFI PI, LAX A, BEDONI M. **COVID-19 salivary Raman fingerprint: innovative approach for the detection of current and past SARS-CoV-2 infections.** Sci Rep. 2021 ;13;11(1):1-13.
15. CARPENTER G.H.. **The secretion, components, and properties of saliva,** Ann. Rev. Food Sci. Technol. 4 (2013) 267–276.
16. CLAIRE K, MUROK K, FERNANDES LS, LEDNEV IK. **Sex determination based on Raman spectroscopy of saliva traces for forensic purposes.** Anal Chem. 2016 20;88(24):12489-12493. doi: 10.1021/acs.analchem.6b03898.
17. CONWAY PJW, HERZOG W, , ZHANG Y, HASLER EM, LADLY K. **Forces required to cause cavitation during spinal manipulation of the thoracic spine.** Clin Biomech 1993;8:210–4.
18. COOK AJ, WOOLF CJ, WALL PD, MCMAHON SB. **Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input.** Nature 1987;325:151–3.
19. CZAMARA K, MAJZNER K, PACIA MZ, KOCHAN K, KACZOR A, BARANSKA M. **Raman spectroscopy of lipids: a review.** J Raman Spectrosc. 2015;46:4-20.
20. DAWES C, **Rhythms in salivary flow rate and composition,** Int. J. Chronobiol. 2 (1974) 253–279.
21. DAWES C., **Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man,** J. Dent. Res. 66 (Spec No) (1987) 648–653.
22. DEBOER KF, SCHUTZ M, MCKNIGHT ME. **Acute effects of spinal manipulation on gastrointestinal myoelectric activity in conscious rabbits.** Manual Med 1988;3:85–94
23. DENSLOW JS, KORR IM, KREMS AD. **Quantitative studies of chronic facilitation in human motoneuron pools.** Am J Physiol 1947;150: 229–38.

24. DERRUAU S, ROBINET J, UNTEREINER V, PIOT O, SOCKALINGUM GD, LORIMIER S. **Vibrational spectroscopy saliva profiling as biometric tool for disease diagnostics: A systematic literature review.** *Molecules*. 2020 3;25(18):4142.
25. DESAI S, ET AL **Raman spectroscopy-based detection of RNA viruses in saliva: A preliminary report.** *J. Biophotonics*. 2020;13:e202000189.
26. GIBBONS R. W. **Assessing the Oracle at the Fountain Head: B.J. Palmer and His Times, 1902-1961.** *Chiropractic History* Volume 7, No.1 • 1987
27. GIBBONS R. W. **Solon Massey Langworthy: Keeper of the Flame During the 'Lost Years' of Chiropractic.** *Chiropractic History* . Volume 1. Number 1. 1981. Paper presented to the first conference on Chiropractic History. The Smithsonian, Washington, D.C .. June 6. 1981. [http://philosophyofchiropractic.com/wp-content/uploads/2012/04/Langworthy\\_biography.pdf](http://philosophyofchiropractic.com/wp-content/uploads/2012/04/Langworthy_biography.pdf) 19/01/22 10:00 hs
28. GIBBONS, J D; CHAKRABORTI, S. **Nonparametric Statistical Inference.** 5<sup>a</sup> ed. CRC Press, 2010.
29. GONCHUKOV, S.; SUKHININA A., BAKHMUTOV D., AND MINAEVA S.. **Raman spectroscopy of saliva as a perspective method for periodontitis diagnostics.** *Laser Phys. Lett.* 9, No. 1, 73–77 (2012) / DOI 10.1002/lapl.201110095
30. GUIONET, A. FUJIWARA T. SATO H. K. TAKAHASHI, K. TAKAKI, K. MATSUI, M. TANINO, T. OHSHIMA T. **Pulsed electric fields act on tryptophan to inactivate  $\alpha$ -amylase.** *Journal of Electrostatics* Volume 112, July 2021, 103597
31. HALDEMAN S. **Neurologic Effects of the Adjustment.** *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* Volume 23 , Number 2 , February 2000.
32. HALDEMAN S. **Spinal manipulative therapy; a status report.** *Clin Orthop* 1983;179:62–70.
33. HALDEMAN, S.; MEEKER, W. **Chiropractic: a profession at the crossroads of mainstream and alternative medicine.** *Ann Intern Med.* 2002; 136: 216– 227.
34. HANLON E B, ET AL. **Prospects for in vivo Raman spectroscopy.** *Phys. Med. Biol.* 45 (2000) R1–R59.
35. HERNÁNDEZ B, COIĆ Y, PFLÜGER F, KRUGLIK SG, GHOMI M. **All characteristic Raman markers of tyrosine and tyrosinate originate from phenol ring fundamental vibrations.** *J Raman Spectrosc.* 2016;47:210-220.
36. HERNÁNDEZ B, PFLÜGER F, KRUGLIK SG, GHOMI M. **Characteristic Raman lines of phenylalanine.** *J Raman Spectrosc.* 2013;44:827-833.

37. HERZOG W, CONWAY PJ, KAWCHUK GN, ZHANG Y, HASLER EM. **Forces exerted during spinal manipulative therapy.** Spine 1993;18:1206–12.
38. HESSEL BW, HERZOG W, CONWAY PJW, MCEWEN MC. **Experimental measurement of the force exerted during spinal manipulation using the Thompson technique.** J Manipulative Physiol Ther 1990;13:448–53.
39. HIMELFARB, I.; HYLAND J, OUZTS N. **Practice analysis of chiropractic 2020.** <https://www.nbce.org/practice-analysis-of-chiropractic-2020/>. Published 2020. Accessed September 18, 2020
40. HUGHES F P. **Reduction of cortisol levels and perceived anxiety in patient undergoing chiropractic management for neck pain and headache: a case report and review of the literature.** J contemp chiropr 2020, volume 3.
41. INSCORE F, SHENDE C, SENGUPTA A, HUANG H, AND FARQUHARSON S, **Detection of Drugs of Abuse in Saliva by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS),** Appl. Spectrosc. 65, 1004-1008 (2011)
42. JOHNSON C.D.; GREEN, B.N.;. **Looking back at the lawsuit that transformed the chiropractic profession part 1: Origins of the conflict J Chiropr Educ (2021) 35 (S1): 9–24.)**
43. *KEATING J. C..ET.AL. Chiropractic History: A Primer .* Secretary & Historian, National Institute Of Chiropractic Research Director, Association for the History of Chiropractic (c) 2004, Association for the History of Chiropractic, Davenport, Iowa, Retrieved 2008-06-16 p.5-46.
44. KOLJENOVIC S. ET AL. **Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue.** Journal of Biomedical Optics d November/December 2004 d Vol. 9 No. 6
45. KORR IM. **Proprioceptors and somatic dysfunction.** J Am Osteopath Assoc 1975;74:638–50.
46. KRONENBERG H; MELMED S; POLONSKY K; Larsen P R. **Williams Tratado de Endocrinologia – Kronenberg.** Edição: 11ª. p 1560. (2010). ISBN: 9788535230963.
47. KUMAR S, RAI SB. **Spectroscopy studies of L-arginine molecule.** Indian J Pure Appl Phys. 2010;48:251-255.
48. LEACH RA. **The chiropractic theories,** 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994
49. LL GUIMARÃES, LPMSR NITA, W TOMA, MTT PACHECO, L SILVEIRA **Characterization of the degradation of dipyron (metamizole) in expired oral pharmaceutical products by Raman**

- spectroscopy and principal component analysis (PCA) Instrumentation Science & Technology, 1-16. 2022
50. MALATHI M, MYTHIL SI, VASANTHI H R. **Salivary Diagnostics: A. Brief Review**. ISRN Dentistry. V. 2014, ID 158786, 8 pages.
  51. MANZANO G P. MOLINA F, VEJA R L. AMAT A M., ACHALANDABASO A., CONTRERAS F H. **Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation**. journal of orthopaedic & sports physical therapy. volume 44. number 4. april 2014.
  52. MINAEVA, S. **Raman spectroscopy of saliva as a perspective method for periodontitis diagnostics**. Laser Physics Letters · January 2012
  53. NAKAJIMA R, IMANAKA T, AIBA S. **Comparison of amino acid sequences of eleven different a-amylases**. Appl Microbiol Biotechnol. 1986;23:355-360.
  54. NESTLER EJ, CARLEZON JR WA. **The mesolimbic dopamine reward circuit in depression**. Biol Psychiatry. 2006;59(12):1151-1159.
  55. OGURA T, TASHIRO M, MASUD M, WATANUKI S, SHIBUYA K, YAMAGUCHI K, ITOH M, FUKUDA H, YANAI K. **Cerebral metabolic changes in men after chiropractic spinal manipulation for neck pain**. Altern Ther Health Med. 2011 Nov-Dec;17(6):12-7.
  56. PICKAR J. G.. **Neurophysiological effects of spinal manipulation**. The Spine Journal 2 (2002) 357–371
  57. ROBLEGGA E, COUGHRANB A., SIRJANIB D.. **Saliva: An all-rounder of our body**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 142 (2019) 133–141
  58. SAMPATH, K .K., BOTNMARK E., MANI R, COTTER J. D., KATARE R, MUNASINGHE P E ,TUMILTY E,. **Neuroendocrine Response Following a Thoracic Spinal Manipulation in Healthy Men** . journal of orthopaedic & sports physical therapy . volume 47. number 9. september 2017
  59. SATO A, SWENSON RS. **Sympathetic nervous system response to mechanical stress of the spinal column in rats**. J Manipulative Physiol Ther 1984;7:141–7.
  60. STRECKFUS CF, BIGLER LR. **Saliva as a diagnostic fluid**. Oral Diseases (2002) 8, 69–76
  61. TALARI, A.C.S. MOVASAGHI,Z. REHMAN, S. REHMAN, I. **Raman Spectroscopy of Biological Tissues**. Applied Spectroscopy Reviews, 50:46–111, 2015
  62. TEUBL, B. J. ET AL **The effect of saliva on the fate of nanoparticles**, Clin. Oral Invest. 22 (2018) 929–940.

63. THAYSEN J.H., THORN N.A., SCHWARTZ I.L, **Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva**, *Am. J. Physiol.* 178 (1954) 155–159.
64. TUCHIN PJ. **The effect of chiropractic spinal manipulative therapy on salivary cortisol levels.** *Australas Chiropr Osteopathy.* 1998 Jul;7(2):86-92.
65. VERNON H. **Qualitative review of studies of manipulation-induced hypoalgesia.** Plenary paper for the 1999 World Chiropractic Congress. *J Manipulative Physiol Ther* 2000;23:137-42.
66. VIRKLER K, LEDNEV IK. **Forensic body fluid identification: the Raman spectroscopic signature of saliva.** *Analyst.* 2010;135(3):512-7. doi: 10.1039/b919167g.
67. WARDWELL, W. **The Cutting Edge of Chiropractic Recognition: Prosecution and Legislation In Massachusetts.** *Chiropractic History*, 1982, No.2, p. 63.
68. WHELAN T L, DISHMAN D, BURKE J, LEVINE S, SCIOTTI V. **The effect of chiropractic manipulation on salivary cortisol levels.** Volume 25, Issue 3, March–April 2002, Pages 149-153
69. XIAOZHOU L, TIANYUE Y,A AND JUNXIU L. **Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy.** *Journal of Biomedical Optics* 17(3), 037003 (March 2012)