

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HECTOR ENRIQUE GIANA

**ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS
EM SORO HUMANO: COMPARAÇÃO ENTRE EQUIPAMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

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

São José dos Campos, 06/2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HECTOR ENRIQUE GIANA

**ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS
EM SORO HUMANO: COMPARAÇÃO ENTRE EQUIPAMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

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

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, 06/2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HECTOR ENRIQUE GIANA

ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS EM SORO HUMANO: COMPARAÇÃO ENTRE EQUIPAMENTOS

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

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

Orientador

Doutorado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Fernanda Malagutti Tomé (externo)

Universidade Paulista

Prof. Dr. Adriano Moraes da Silva (externo)

Rede pública de saúde do Canadá: Horizon Health Network

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Egberto Munin (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Fernanda Sant Ana de Siqueira e Oliveira (Suplente)

Universidade Paulista

Profa. Dra. Luciana Aparecida Campos Baltatu (Suplente)

Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, 06/2025

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

HECTOR ENRIQUE GIANA

Formação acadêmica:

1969 – 1976: Graduação em Bioquímica Clínica. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

1981 – 1983: Graduação em Farmácia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

1983 – 1985: Especialização em Análises Clínicas. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP.

1998 – 2000: Mestrado em Engenharia Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP.

Atuação profissional:

Direção do Laboratório Oswaldo Cruz, São José dos Campos, SP.

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

G37a Giana, Hector Enrique
Espectroscopia Raman portátil para quantificação de analitos em soro humano: comparação entre equipamentos / Hector Enrique Giana – 2025.
139 f.: 30 cm.

Orientador: Dr. Landulfo Silveira Jr.
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade Anhembi Morumbi,
São Paulo, 2024.
Bibliografia: f. 128 - 138.

1. Espectroscopia Raman. 2. Controle de qualidade. 3. Analitos sanguíneos 4. Dislipidemias 5. Regressão Multivariada 6. Mínimos quadrados parciais (PLS). I. Título.

CDD 616.065

DEDICATÓRIA

Quero expressar minha mais profunda gratidão a todos aqueles que fizeram parte desta jornada que culmina com a conquista do título de Doutor, não pelo título em si, mas pelo significado e responsabilidade social que isto implica. É impossível nominá-los a todos porque, sendo tantos, mesmo que muitos não tenham conhecimento desta minha aspiração de colaborar com o bem estar da humanidade, foram objeto desta caminhada, incentivando com sua ação a cada instante, para reafirmar minha vontade de conseguir o fim proposto.

A todos eles dedico este trabalho, na esperança de que outros pesquisadores possam avançar no caminho da descoberta de novos métodos que possibilitem minorar o sofrimento humano e o advento de um mundo melhor.

Faço uma menção especial à minha querida mãe que não conseguiu ficar neste mundo para vivenciar este momento, mas tenho certeza que se orgulharia até o infinito em ver seu filho, mesmo não sendo tão jovem, alcançar o sonho que ela acalentou toda sua vida: vê-lo transformado num cientista que ajudaria o mundo a ser melhor.

AGRADECIMENTOS

Este momento não é apenas uma realização pessoal, mas um reflexo do apoio e da colaboração de muitas pessoas ao longo do caminho.

À minha família e aos meus amigos, extensão desta, que sempre estiveram ao meu lado, com amor incondicional, paciência e compreensão, me dando o suporte emocional necessário em cada momento desta caminhada, que me proporcionaram momentos de descontração e motivação, lembrando-me da importância de manter o equilíbrio entre os estudos e as alegrias da vida, muito agradeço. Sem o incentivo e o apoio de vocês, essa jornada teria sido muito mais difícil.

À Namir, minha companheira, que lutou e luta pela mesma causa.

Ao meu amigo orientador deste trabalho, Prof. Dr. Landolfo Silveira Jr., à Dra. Maiara Schulz do Laboratório ViValle de São José dos Campos, pelo apoio na obtenção das amostras de soro, a Lucas Pires, da Anton Paar Brasil Ltda. pelo empréstimo do espectrômetro Cora 5001, à Dra. Luisa Oliveira Souza, pela ajuda teórico-prática neste trabalho, aos professores e colegas de pesquisa, agradeço imensamente pelo conhecimento compartilhado, pelas orientações valiosas e pelas discussões enriquecedoras que impulsionaram meu trabalho. Cada um de vocês contribuiu de maneira significativa para o meu crescimento como ser humano.

Ao Prof. Dr. Renato A. Zângaro, coordenador do curso, pelo seu apoio e incentivo para seguir em frente – apesar da minha idade, não só com palavras técnico-científicas, mas com frases de motivação apropriadas que diariamente chegaram ao meu coração.

À Universidade Anhembi Morumbi pela concessão da bolsa de estudo durante o doutorado, pela estrutura e confiança em mim depositada.

E, finalmente, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho. Cada palavra de incentivo, cada gesto de apoio fez a diferença. Este título não é só meu, é nosso! Obrigado a todos!

L. Silveira Jr. agradece o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) para a aquisição do espectrômetro Raman de bancada (Processo No. 2009/01788-5) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a aquisição do espectrômetro Raman portátil (Processo No. 460014/2014-5).

***“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”***

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A qualidade dos resultados das análises laboratoriais é de extrema importância e relevância para o diagnóstico. Controles internos e externos de qualidade (CIQ e CEQ, respectivamente) e inovações tecnológicas são rotineiramente empregados para minimizar erros e substituir rotinas manuais por processos automatizados, procurando oferecer resultados rápidos e confiáveis, com custo acessível. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de um espectrômetro Raman portátil para quantificar a concentração de analitos sanguíneos, comparando seu desempenho com outro equipamento portátil com características semelhantes e um de bancada, de maior eficiência óptica e resolução espectral, mas de grande tamanho e de difícil utilização em campo a fim de viabilizar um método espectroscópico rápido, preciso, reprodutível e econômico para a quantificação de analitos e ser usado na triagem populacional. **Metodologia:** Foram obtidas 193 amostras de soro humano, e os espectros Raman foram adquiridos em três espectrômetros: dois equipamentos portáteis (excitação 785 nm) e um de bancada (excitação 830 nm). Foram identificados picos Raman correspondentes aos analitos sanguíneos relacionados a distúrbios cardiovasculares, renais e metabólicos: triglicérides (TRI), colesterol (COL), colesterol de alta densidade (HDL), creatinina (CRE), ureia (URE) e glicose (GLI). As concentrações destes analitos, obtidas por espectrofotometria, foram modeladas por regressão multivariada baseada em mínimos quadrados parciais (PLS) a fim de obter-se a predição da concentração sérica. O modelo PLS foi empregado em análise discriminante (PLS-DA) para classificar as amostras nos grupos Alteradas ou Normais, utilizando os valores da espectrofotometria para validar os resultados. **Resultados:** O modelo PLS forneceu correlação forte ($r > 0,80$) para TRI e COL, com erro médio quadrático (RMSEcv) de 42,0 e 22,0 mg/dL respectivamente, no equipamento de bancada e em um dos portáteis. As taxas de acertos na classificação entre Alteradas e Normais foram maiores que 90% para TRI e COL no equipamento de bancada, o que sugere possibilidade de utilização em triagem para análises clínicas. Outros analitos testados como CRE, URE e GLI (relacionados a doenças renais e diabetes), e HDL, (eliminação de cristais de colesterol das artérias), apresentaram correlação moderada ($r < 0,50$ e RMSEcv $> 30,0$ mg/dL) ou fraca ($r < 0,30$ e RMSEcv $> 14,0$ mg/dL), dado que, nas concentrações fisiológicas, o sinal espalhado por estes

compostos é muito fraco. A adição de solução de glicose que objetivou aumentar o sinal espalhado pelo analito, melhorou discretamente os valores de r e RMSEcv dos analitos TRI e COL, porém não melhorou r e RMSEcv do analito GLI. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a espectroscopia Raman tem potencial para se tornar um apoio à rotina laboratorial, podendo ter aplicações futuras em triagem laboratorial para os analitos triglicérides e colesterol.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; controle de qualidade; analitos sanguíneos; dislipidemias; regressão multivariada; mínimos quadrados parciais (PLS).

PORTABLE RAMAN SPECTROSCOPY FOR QUANTIFICATION OF ANALYTES IN HUMAN SERUM: COMPARISON BETWEEN EQUIPMENT

ABSTRACT

Introduction: The quality of laboratory analysis results is extremely important and relevant for diagnosis. Internal and external quality controls (CIQ and CEQ, respectively) and technological innovations are routinely used to minimize errors and replace manual routines with automated processes, seeking to offer fast and reliable results at an affordable cost. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the use of a portable Raman spectrometer to quantify the concentration of blood analytes, comparing its performance with another portable equipment with similar characteristics and a benchtop equipment, with greater optical efficiency and spectral resolution, but large size and difficult to use in the field, in order to enable a fast, accurate, reproducible and economical spectroscopic method for analyte quantification to be used in population screening. **Methodology:** A total of 193 human serum samples were obtained, and the Raman spectra were acquired in three spectrometers: two portable equipment (excitation 785 nm) and one benchtop equipment (excitation 830 nm). Raman peaks corresponding to blood analytes related to cardiovascular, renal and metabolic disorders were identified: triglycerides (TRI), cholesterol (CHO), high-density cholesterol (HDL), creatinine (CRE), urea (URE) and glucose (GLU). The concentrations of these analytes, obtained by spectrophotometry, were modeled by multivariate regression based on partial least squares (PLS) in order to obtain the prediction of serum concentration. The PLS model was used in discriminant analysis (PLS-DA) to classify the samples into the Altered or Normal groups, using the spectrophotometry values to validate the results. **Results:** The PLS model provided a strong correlation ($r > 0.80$) for TRI and CHO, with mean square error (RMSE_{cv}) of 42.0 and 22.0 mg/dL, respectively, in the benchtop equipment and in one of the portable equipment. The rates of correct answers in the classification between Altered and Normal were greater than 90% for TRI and CHO in the bench equipment, which suggests the possibility of using it in screening for clinical analyses. Other analytes tested, such as CRE, URE and GLU (related to kidney diseases and diabetes), and HDL (elimination of cholesterol crystals from the arteries), showed moderate ($r < 0.50$ and RMSE_{cv} > 30.0 mg/dL) or weak ($r < 0.30$ and RMSE_{cv} > 14.0 mg/dL), given that, at physiological concentrations, the signal spread by these compounds is very weak. The addition of glucose solution that aimed to increase the signal spread by the analyte, slightly improved the r and RMSE_{cv} values of the TRI and CHO analytes, but did not

improve the r and RMSE_{cv} of the GLU analyte. **Conclusion:** The results suggest that Raman spectroscopy has the potential to become a support to routine laboratory testing, and may have future applications in laboratory screening for triglyceride and cholesterol analytes.

Keywords: Raman spectroscopy; quality control; blood analytes; dyslipidemias; multivariate regression; Partial least squares (PLS).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Desenho esquemático simplificado de um espectrômetro Raman típico. 39
- Figura 2 – Gráfico representativo para as frequências Stokes e anti-Stokes. A frequência central está relacionada ao espalhamento elástico (Rayleigh).....40
- Figura 3 – Exemplo do uso da espectroscopia Raman na identificação de substâncias. Os espectros mostrados são todos de pigmentos brancos: (a) branco de chumbo (carbonato de chumbo); (b) branco de ossos (fosfato de cálcio) e (c) gipsita (sulfato de cálcio hidratado). Fonte: Faria, 2011.....41
- Figura 4 – Processos de espalhamento da luz incidente sobre a matéria.44
- Figura 5 – Três possíveis estados de movimentação de uma molécula.45
- Figura 6 – Estado translacional de uma molécula, nas três direções permitidas. Fonte: Claro, 2018.....45
- Figura 7 – Estado rotacional de uma molécula, nas três direções permitidas.....46
- Figura 8 – Possíveis vibrações da molécula de água. (a) modo de estiramento simétrico, (b) modo de estiramento assimétrico e (c) modo de variação angular.47
- Figura 9 – (A) Diagrama de Jablonskii com o desenho esquemático de excitação de uma molécula do estado fundamental E_0 para o estado excitado E_1 pelo fornecimento de energia E_f . (B) Elevação do elétron ao nível de energia virtual E_V por um fóton que possui a mesma energia que a diferença de energia entre os dois níveis, $E_V = E_f$. (C) Fóton espalhado inelasticamente com energia menor, $E_V - E_f$. (D) Fóton espalhado com energia maior, $E_V + E_f$. Fonte: Guedes; Moreira, 2022.....48
- Figura 10 – Molécula de HCl (A) antes e (B) depois de receber energia de três frequências diferentes de um feixe de luz infravermelha, e seu momento de dipolo (C).....50
- Figura 11 – Desenho esquemático do momento de dipolo do CO_2 com estiramento simétrico.....51
- Figura 12 – Modos de vibração da molécula de CCl_4 mostrando 4 dos 9 picos, sendo que o pico em 770 cm^{-1} é constituído por 3 modos de vibração que

possuem a mesma energia e portanto coincidem na mesma faixa espectral. Fonte: Guedes; Moreira, 2022.	52
Figura 13 – Comparação dos espectros de absorção no infravermelho (FTIR, linha superior) e Raman (linha inferior) da 2-etinilpiridina. Fonte: Faria, 2011	55
Figura 14 – Etapas de pré-processamento aplicadas a espectros Raman: (A) Exemplo de espectro bruto mostrando os picos de raios cósmicos. (B) O mesmo espectro com a retirada dos raios cósmicos e a marcação da linha de base. (C) Remoção da linha de base (fluorescência e luz difusa). (D) O mesmo espectro normalizado. (E) Aplicação do filtro tipo Savitzky-Golay.	73
Figura 15 – Fluxograma com as etapas da pesquisa.	87
Figura 16 – Esquerda: espectro bruto adquirido de uma lâmpada de tungstênio. Direita: o mesmo espectro, corrigido para a resposta do espectrógrafo. Fonte: IS Instruments, 2017.	89
Figura 17 – Diagrama esquemático para coleta do espectro da lâmpada de filamento e obtenção da curva de correção de resposta da intensidade.	90
Figura 18 – Plotagem da intensidade de sinal de uma amostra transparente de benzonitrila e do recipiente de vidro em função da posição do foco do laser, estando a posição zero situada no centro do frasco. Fonte: Anton Paar (2018).	92
Figura 19 – Diferentes posições da incidência da luz em uma amostra líquida em tubo porta-amostras de vidro, em relação à ponta de fibra do foco do laser. Fonte: Anton Paar, 2018.	92
Figura 20 – Dois modelos de porta-amostras em alumínio com oito orifícios, com volumes de 300 e 400 μL	93
Figura 21 – Porta-amostras em alumínio com oito furos, com volume de 80 μL	94
Figura 22 – Porta-amostras em alumínio anodizado preto-fosco, com volume de 400 μL	94
Figura 23 – Porta-amostras tipo placa de Kline, em vidro, com volume de 300 μL	94
Figura 24 – Porta-amostras tipo microplaca de microtitulação, em poliestireno, com volume de 100 μL	95
Figura 25 – Componentes mecânicos utilizados no espectrômetro #2 relacionados à colocação da amostra a ser analisada, conforme apresentação no	

manual do aparelho e site do fabricante. Fonte: Azo Nano: <https://www.azonano.com/equipment-details.aspx?EquipID=2250>.... 104

Figura 26 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro humano obtidos com cada um dos três espectrômetros Raman. O número de amostras de soro analisadas com cada espectrômetro foi: 42, 100 e 51 para os espectrômetros #1, #2 e #3, respectivamente. O espectro do espectrômetro #3 é visivelmente melhor, e a sua RSR foi quase o dobro da RSR dos espectrômetros portáteis. 106

Figura 27 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro humano conforme Figura 26, e indicação das posições dos picos Raman dos constituintes basais: colesterol, ácidos graxos saturados (AGS) e insaturados (AGI) (triglicérides, que têm bandas espectrais características de lipídios), glicose, ureia e creatinina. Os picos rotulados são os encontrados nos espectros dos compostos basais. O espectro sérico apresenta outros picos além dos citados, e reflete sua composição principal de proteínas (principalmente albumina), e de outros metabolitos. 107

Figura 28 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #1 (portátil, modelo Cora 5200). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem. 110

Figura 29 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetros #2 (portátil, modelo Cora 5001-785). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem. 111

Figura 30 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada, modelo Dimension P-1-HR), sem o filtro SG. Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem. 112

Figura 31 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) <i>versus</i> as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada, modelo Dimension P-1-HR), com o filtro SG. Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem.	113
Figura 32 – Gráfico da curva de linearidade da amostra de soro “pool” com a amostra de soro “pool” glicosado, com as correlações das concentrações reais <i>versus</i> as concentrações previstas pela regressão PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada).....	114
Figura 33 – Gráficos com as correlações das concentrações dos analitos das amostras de soro testados com adição de glicose, sem a aplicação do filtro SG, obtidas pelo método padrão <i>versus</i> as concentrações previstas pelo modelo PLS, utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LV são apresentados no gráfico.....	116
Figura 34 – Gráficos com as correlações das concentrações dos analitos das amostras de soro testados com adição de glicose, com a aplicação do filtro SG, obtidas pelo método padrão <i>versus</i> as concentrações previstas pelo modelo PLS, utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LV são apresentados no gráfico.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as diversas técnicas espectroscópicas úteis em avaliação molecular.....	42
Tabela 2 – Exemplos de graus de liberdade em várias moléculas.....	46
Tabela 3 – Posição do pico Raman característico para os grupos funcionais das diferentes ligações químicas.	53
Tabela 4 – Posição dos picos Raman característicos para alguns analitos bioquímicos de interesse.....	54
Tabela 5 – Características gerais mostrando vantagens e desvantagens dos diversos tipos de espectrômetros Raman.	69
Tabela 6 – Valores médios de CV% para o espectrofotômetro Cobas Integra 400 Plus, valores estes obtidos a partir dos resultados das quantificações dos controles analíticos da Controlab em relação aos grupos Referência e Alterado.....	85
Tabela 7 – Especificações técnicas e características dos três espectrômetros utilizados para a coleta dos espectros nas amostras de soro.	86
Tabela 8 – Diluições do soro “pool” (concentração de 114 mg/dL de glicose) com soro “pool” glicosado (concentração 600 mg/dL – solução B) para obtenção da curva de linearidade da glicose em soro.	96
Tabela 9 – Diluição da amostra de soro “pool” com solução de glicose comercial diluída (25,0 g/dL em água destilada) para a preparação do soro teste com glicose adicionada (soro glicosado).....	97
Tabela 10 – Posições e atribuições vibracionais das bandas dos principais picos Raman, alguns deles mostrados na Figura 27 e referidos na literatura.	108
Tabela 11 – Valores obtidos no modelo de regressão PLS para cada um dos analitos testados nas amostras de soro, indicando os parâmetros correspondentes: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro da validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; número de LVs = número de variáveis latentes.	109
Tabela 12 – Valores obtidos das medições dos analitos testados nos espectros das amostras de soro a testar com adição de glicose, sem e com a	

aplicação do filtro SG, indicando os parâmetros correspondentes: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro da validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; LV = variáveis latentes para o espectrômetro #3. 115

Tabela 13 – Tabela de confusão com os resultados do modelo de classificação aplicados aos espectros dos analitos TRI e COL obtidos em cada um dos espectrômetros..... 118

Tabela 14 – Comparação dos valores de r e RMSEcv dos analitos TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI para os três espectrômetros testados, com a utilização de soro sem e com adição de glicose e a aplicação ou não do filtro SG nos espectros. 122

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Asymmetric least square – mínimos quadrados assimétricos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APD	Avalanche photodiode – fotodiodo de avalanche
CAP	College of American Pathologists – Colégio de Patologistas Americanos
CCD	Charge-coupled device – dispositivo de carga acoplada
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CEQ	Controle externo da qualidade
CIQ	Controle interno da qualidade
COL	Colesterol total
CONTROLLAB	Controle de Qualidade para Laboratórios
CRE	Creatinina
CV	Coeficiente de variação
DATASUS	Departamento de Informação e Informática do SUS
DICQ	Departamento de Inspeção e Certificação da Qualidade
DM	Diabetes mellitus
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
EIA	Enzymatic immunoassay – Enzimaimunoensaio
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay – Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
FT	Transformada de Fourier
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GBD	Global Burden of Disease – Carga Global de Doenças
GLI	Glicose
HDL	High density lipoprotein – lipoproteínas de alta densidade
HIV	Human immunodeficiency vírus - vírus da imunodeficiência humana
IDF	International Diabetes Federation – Federação Internacional de Diabetes
IR	Infrared – Infravermelho
ISO	International Organization for Standardization – Organização Internacional para Padronização
IVM	Infravermelho médio

IVP	Infravermelho próximo
LDL	Low density lipoprotein – lipoproteínas de baixa densidade
MIR	Mid infrared – Infravermelho médio
MSC	Multiplicative scatter correction - Correção de espalhamento multiplicativo
NCD-Risc	NCD Risk Factor Collaboration – Dados de risco para doenças crônicas
NIR	Near infrared – Infravermelho próximo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONA	Organização Nacional de Acreditação
PALC	Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos
PCA	Principal component analysis – análise de componente principal
PCR	Proteína C-reativa
PC	Principal component – componente principal
PLSR	Partial least square regression – regressão por mínimos quadrados parciais
PMT	Photomultiplier tube – tubo fotomultiplicador
PNCQ	Programa Nacional de Controle da Qualidade
PRO-EX	Controle Externo da Qualidade
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RMSEcv	RMSECV / Root mean square error of cross validation - erro quadrático médio da validação cruzada
RMSEP	Root mean square error of prediction - erro quadrático médio da previsão
RSR	Relação sinal/ruído
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SERS	Surface enhanced Raman spectroscopy – espectroscopia Raman intensificada por superfície
SIM	Sistema de informação de mortalidade
SM	Síndrome metabólica
SPAD	Single-photon avalanche diode – diodo de avalanche de fóton único
SUS	Sistema Único de Saúde
TRI	Triglicérides
TRS	Terapia renal substitutiva
UAM	Universidade Anhembi Morumbi

URE

Ureia

VDRL

Veneral Disease Research Laboratory – Estudo Laboratorial de Doenças Venéreas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. JUSTIFICATIVA.....	25
1.2. OBJETIVOS.....	26
1.2.1. Objetivo Geral	26
1.2.2. Objetivos Específicos	27
1.3. HIPÓTESE	27
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS ASSOCIADAS.....	29
2.1.1. Doenças cardiovasculares	31
2.1.2. Diabetes mellitus	31
2.1.3. Doenças renais	32
2.2. ESPECTROFOTOMETRIA E CONTROLE DE QUALIDADE	32
2.2.1. Espectrofotometria	32
2.2.2. Controle de qualidade	34
2.2.3. Controle de qualidade dos resultados analíticos do espectrofotômetro	35
2.2.4. Técnica Raman	37
2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	38
2.3.1. Fundamentos do espalhamento Raman	38
2.3.2. Interação da luz com as vibrações moleculares	47
2.3.3. O espalhamento Raman e a absorção no infravermelho	49
2.3.4. Espectroscopia Raman aplicada à quantificação de analitos séricos e metabólitos sanguíneos	56
2.4. ESPECTRÔMETROS RAMAN.....	67
2.4.1. Tipos de espectrômetros Raman	67
2.4.2. Tipos de porta amostras	69
2.4.3. Pré-processamento dos espectros	72
2.4.3.1. Raios cósmicos	74
2.4.3.2. Linha de base	74
2.4.3.3. Fluorescência de fundo e luz difusa	75
2.4.3.4. Normalização	75

2.5. PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS – REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA..	77
2.5.1. Métodos quimiométricos	78
2.5.2. Análise de componente principal (PCA).....	79
2.5.3. Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS	81
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
3.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	83
3.2. AMOSTRAS DE SORO HUMANO.....	83
3.3. ANALITOS TESTADOS.....	84
3.3.1. Controle de Qualidade	85
3.4. ESPECTRÔMETROS UTILIZADOS	86
3.5. COLETA DOS ESPECTROS RAMAN.....	87
3.5.1. Calibração da resposta espectral.....	88
3.5.2. Influência da posição do foco	91
3.5.3. Ensaios com diferentes porta-amstras	93
3.6. CONFECÇÃO DE CURVA DE LINEARIDADE POR ADIÇÃO DE GLICOSE AO SORO	95
3.7. TRATAMENTO DE DADOS.....	97
3.8. MODELO DE REGRESSÃO MULTIVARIADO PARA QUANTIFICAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DOS ANALITOS	98
3.9. CLASSIFICAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS DE INTERESSE	100
3.10. INFORMAÇÕES SOBRE O SERS	102
4. RESULTADOS	104
4.1. ESCOLHA DO PORTA-AMOSTRAS.....	104
4.2. ESPECTROS RAMAN DO SORO	105
4.3. PICOS ESPECTRAIS DOS ANALITOS ESTUDADOS.....	106
4.4. CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS ESTIMADAS PELO MODELO PLS	108
4.5. CURVA DE LINEARIDADE POR ADIÇÃO DE GLICOSE	113
4.6. CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE SORO COM ADIÇÃO DE GLICOSE ESTIMADAS PELO MODELO PLS	114
4.7. RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS DE INTERESSE.....	118
5. DISCUSSÃO	119
5.1. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE r E DE $RMSE_{cv}$ OBTIDOS COM O MODELO PLS COM OS OBTIDOS NA LITERATURA	119

5.2. COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TRÊS EQUIPAMENTOS E O CEQ DO PNCQ	121
5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
6. CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXO	139

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil e no mundo (Chaves *et al.* 2016; Ramasamy, 2016), estando associadas a síndrome metabólica (SM), que descreve um conjunto de fatores de risco que aumentam as chances de um indivíduo desenvolver doenças cardíacas, acidentes vasculares, arteriosclerose e doença arterial coronariana (Chunxiu, 2009), assim como diabetes mellitus (DM). A SM tem como base, além de fatores genéticos, a resistência à ação da insulina (responsável pelo metabolismo da glicose), excesso de peso (devido principalmente ao aumento de gordura na região abdominal) e sedentarismo, que resulta em níveis alterados de colesterol e outros lipídios no sangue (dislipidemias).

A determinação das concentrações de alguns analitos sanguíneos é importante para o diagnóstico e o manejo clínico de distúrbios metabólicos e outras condições médicas como a insuficiência renal (Ramasamy, 2016) e o DM. O aumento das concentrações de ureia e creatinina no sangue pode sugerir uma disfunção renal, o nível aumentado de glicemia é um dos indicadores de DM, e níveis alterados de colesterol total, colesterol de alta densidade (HDL) e triglicérides estão relacionados ao risco aumentado de doenças cardiovasculares.

A avaliação clínica de distúrbios metabólicos é realizada pela análise laboratorial de elementos bioquímicos do soro (analitos sanguíneos). A dislipidemia é avaliada pelas concentrações de colesterol sérico e suas frações (lipoproteínas de baixa densidade – LDL, lipoproteínas de alta densidade – HDL) e triglicérides; a DM e os distúrbios renais são analisados pelos níveis de glicose sérica e de compostos de nitrogênio não proteico (ureia e creatinina) (Momesso *et al.*, 2018), entre outros elementos. Nesse contexto, a qualidade da análise do laboratório é relevante no processo de manutenção da excelência através de programas de controle externo da qualidade (CEQ) (Salle *et al.*, 2017). Além disso, inovações tecnológicas devem ser empregadas de forma continuada para minimizar erros e substituir rotinas manuais e semiautomatizadas por processos totalmente automatizados (Baranska, 2014; Banchs *et al.* 2015). Essas metodologias devem oferecer resultados confiáveis, ter um custo acessível, e produzir resultados rápidos em tempo real (Guzel *et al.*, 2009).

Neste sentido, a espectroscopia Raman tem se destacado como uma ferramenta promissora em análises clínicas, permitindo a identificação e quantificação de analitos de interesse em fluidos biológicos como soro humano e urina, de forma rápida e não destrutiva (Qi e Berger, 2007). Sua capacidade de detectar biomoléculas com alta especificidade, sem necessidade de reagentes ou preparações complexas, torna-a uma alternativa atrativa para o monitoramento de marcadores bioquímicos, como glicose, lipídios, proteínas e metabólitos associados a doenças. A técnica tem tido avanços em sistemas portáteis e inteligência artificial, ampliando sua aplicação em diagnósticos “*point-of-care*”, o que abre a possibilidade de detecção precoce de patologias como diabetes (Dou *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1997), lesão renal (Rohleder *et al.*, 2004; Stosch *et al.*, 2005), câncer (Larsson *et al.*, 1974) e distúrbios metabólicos (Qu *et al.*, 1999; Rohleder *et al.*, 2004) a partir de pequena quantidade de material biológico.

A possibilidade de uso da espectroscopia Raman portátil para triagem de compostos bioquímicos em grandes centros de saúde, especialmente no Sistema Único de Saúde (SUS), mais adequados do que o uso de espectrômetros de bancada em relação à mobilidade, devido a seu menor tamanho e facilidade de manejo, deve tornar-se um desafio para que pesquisadores do mundo todo possam envidar esforços para viabilizar um método rápido, eficaz e de baixo custo para atender às demandas das populações carentes de um sistema que as atenda prontamente.

1.1. JUSTIFICATIVA

A realização de exames laboratoriais permite que se identifique o estado clínico dos pacientes e isto é feito atualmente através de métodos espectrofotométricos. Houve uma verdadeira evolução nos últimos anos a partir da utilização de técnicas analíticas manuais, passando pelas semiautomatizadas até o uso de processos totalmente automatizados, que significaram uma conquista importante com incremento da rapidez e diminuição de custos, com aumento expressivo da precisão, exatidão e reprodutibilidade das análises. A espectroscopia Raman tem sido pesquisada visando alcançar um diagnóstico preciso com rapidez, sem adição de reagentes químicos com preservação da amostra biológica. Este trabalho de pesquisa é justificado com a

esperança de alcançar um método de triagem de alguns compostos bioquímicos com certeza diagnóstica e apresentar baixo custo.

A busca por metodologias analíticas que possam oferecer resultados confiáveis, exatos e precisos, de rápida execução, com baixo custo e com preservação da amostra biológica, dentre outros atributos, têm desafiado pesquisadores ao redor do mundo. A espectroscopia Raman desponta como uma técnica com possível uso em rotinas laboratoriais em análises clínicas (Premasiri *et al.*, 2001; Barman *et al.*, 2012), tendo como vantagem a possibilidade de obtenção da concentração do analito de interesse sem a necessidade de uso de reagentes químicos, com a manutenção da integridade da amostra biológica, minimizando o custo e reduzindo erros de manipulação em comparação com o método espectrofotométrico padrão na análise laboratorial (Colomban *et al.*, 2009; Drees *et al.*, 2010).

Trabalhos similares em equipamentos Raman de bancada evidenciam eficiência quantitativa, mas estes equipamentos são muito grandes para a prática de triagem em campo. O equipamento Raman compacto, a ser testado, apresenta dimensões reduzidas, podendo ser movimentado facilmente sem prejuízo de calibrações posteriores necessárias por deslocamento.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Esta tese pretende verificar e validar o uso da espectroscopia Raman com uso de espectrômetro portátil (excitação em 785 nm), em comparação com espectrômetro de bancada (excitação em 830 nm), como um método rápido, preciso e reprodutível para quantificar a concentração de alguns analitos sanguíneos, como triglicérides (TRI), colesterol (COL), colesterol de alta densidade (HDL), creatinina (CRE), ureia (URE) e glicose (GLI), comparativamente aos resultados de concentração obtidos pela espectrofotometria padrão ouro. Para isto será feita a comparação do desempenho analítico de três modelos de espectrômetros Raman, sendo dois portáteis, mais indicados para trabalho em campo, e um de bancada, com maior resolução e sensibilidade, para quantificação de analitos de interesse relacionados à SM e distúrbios renais a fim de discutir seu uso em triagem e rastreamento.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de detecção dos analitos escolhidos para o teste, utilizando a espectroscopia Raman obtida em dois espectrômetros portáteis comparativamente com um espectrômetro de bancada, a fim de avaliar a viabilidade do método para diagnósticos rápidos em campo;
- Desenvolver modelos espectrais com base na regressão multivariada por PLS para quantificar os analitos testados utilizando os espectros Raman como variáveis independentes e as concentrações obtidas pela metodologia analítica de referência (espectrofotometria padrão ouro) como variáveis dependentes;
- Comparar o desempenho analítico de cada equipamento Raman mediante a análise dos parâmetros: y = expressão da regressão, $RMSE_{cv}$ = erro da validação cruzada, R^2 = coeficiente de determinação, r = coeficiente de correlação de Pearson, LVs = número de variáveis latentes, parâmetros estes estimados em cada um dos três modelos de espectrômetros Raman, para a quantificação dos analitos descritos;
- Determinar quais dos analitos têm maior capacidade de serem detectados pelo modelo de regressão por PLS aplicado aos espectros Raman e que permitam identificar e quantificar estes componentes;
- Obter uma modelo de discriminação baseado em PLS (PLS-DA) para classificar as amostras em grupo com concentração normal (referência) e grupo com concentração alterada, tomando como concentração real a determinada pela metodologia analítica de referência;
- Avaliar a aplicabilidade da espectroscopia Raman portátil para triagem e rastreamento de analitos sanguíneos, considerando as vantagens e limitações em comparação com a espectroscopia Raman de bancada.

1.3. HIPÓTESE

A espectroscopia Raman portátil, aliada a métodos quimiométricos como a regressão por PLS, permite quantificar com precisão clinicamente aceitável os níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, creatinina, ureia e glicose, apresentando

desempenho comparável ao de um espectrômetro de bancada. A técnica pode ser uma alternativa viável, eficiente e de baixo custo em análises clínicas para auxiliar o Sistema Único de Saúde (SUS), oferecendo resultados confiáveis, exatos e rápidos para a triagem laboratorial de amostras biológicas, sem a necessidade de reagentes químicos, mantendo a integridade da amostra e minimizando erros operacionais em comparação com métodos tradicionais como a espectrofotometria.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS ASSOCIADAS

A SM é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco para as doenças crônicas, especialmente a resistência à insulina e o DM, assim como cardiovasculares, geralmente relacionados à deposição central de gordura, associados a um grupo de distúrbios que inclui obesidade, dislipidemia e hipertensão. Além disso, detectar corretamente doenças renais é de extrema importância, pois algumas enfermidades podem não apresentar qualquer sintoma até que os rins já estejam comprometidos.

A prevalência deste tipo de doenças, no Brasil e no mundo, exige um diagnóstico rápido e preciso para poder iniciar os tratamentos correspondentes, aliados a uma prática de vida saudável, com alimentação adequada, exercícios físicos e diminuição da ingestão de sal na dieta.

Alguns testes simples de sangue podem ser utilizados para pesquisar vários tipos de doenças precocemente, evitando assim maiores custos de tratamento posterior, principalmente para o SUS do Brasil. Segundo Nilson *et al.* (2020), em seu artigo intitulado “Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018”, houve 1.829.779 internações pelo SUS por causas associadas à hipertensão arterial, ao DM e à obesidade. Isso corresponde a aproximadamente 16% do total de internações hospitalares pelo SUS no período, resultando em um custo total de R\$ 3,84 bilhões. Os custos ambulatoriais totais com as mesmas doenças pelo SUS somaram R\$ 166 milhões no ano de 2018, e os gastos do Programa Farmácia Popular com medicamentos para hipertensão, DM e asma totalizaram R\$ 2,31 bilhões. Os custos diretos atribuíveis a hipertensão arterial, DM e obesidade no Brasil totalizaram R\$ 3,45 bilhões, considerando os gastos do SUS com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos.

Comparando os custos por tipo de gasto pelo SUS, a maioria se deveu ao fornecimento de medicamentos a pessoas com obesidade, DM e hipertensão arterial (58,8%), seguido por hospitalizações (34,6%) e atendimentos e/ou procedimentos ambulatoriais (6,6%).

Considerando sexo e idade, 56% dos custos totais foram com o sexo feminino e mais de 70% dos custos foram com pessoas de 20 a 69 anos de idade. A hipertensão arterial foi responsável por 59% dos custos diretos (mais de R\$ 2 bilhões por ano), enquanto o DM correspondeu a 30%, e a obesidade a 11% (desconsiderando os custos de hipertensão arterial e DM atribuíveis à obesidade), com pouca variação de acordo com o sexo. Considerando somente as internações hospitalares, os custos atribuíveis a essas três doenças somaram 9,8% de todos os gastos com hospitalizações de adultos no país.

Ainda é importante considerar os impactos da obesidade como fator de risco para hipertensão arterial e DM em adultos, os quais não foram considerados nos custos atribuíveis à obesidade na análise anterior para evitar duplicidade de contagem. No Brasil, o excesso de peso e a obesidade são fatores de risco importantes para hipertensão arterial e DM, coexistindo, assim, em grande parte dos diabéticos e hipertensos. Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013 (2015), uma pesquisa de âmbito nacional e base domiciliar realizada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e pelo Ministério da Saúde, em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mais de 1/3 dos diabéticos (37,0%; IC95%: 34,2 a 39,8%) e dos hipertensos (36,3%; IC95%: 34,8 a 37,7%) eram obesos. Além disso, 75,2% dos diabéticos (IC95%: 72,8 a 77,5%) e 74,4% dos hipertensos (IC95%: 73,0 a 75,7%) apresentavam excesso de peso no Brasil.

Agregar a obesidade a essas comorbidades permite uma estimativa mais completa do impacto econômico da obesidade no SUS. Com a incorporação dos custos da obesidade como fator de risco para hipertensão arterial e DM, os custos totais atribuíveis à obesidade aumentam para R\$ 669 milhões em hospitalizações e gastos ambulatoriais; e para R\$ 722 milhões em gastos com medicamentos, ou seja, um total de R\$ 1,39 bilhão em 2018.

Mais de 60% dos gastos totais atribuíveis à obesidade foram com mulheres, tendo em vista a maior prevalência de obesidade e o maior risco relativo de alguns desfechos, particularmente doenças cardiovasculares, no sexo feminino (Nilson *et al.*, 2020).

2.1.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são as primeiras causas de morte no Brasil e no mundo, com impacto importante no sistema de saúde. Com esse objetivo, desde 2020 a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) mantém o site “Estatística Cardiovascular”, que visa facilitar a obtenção de informações sobre doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e outras formas de doenças vasculares (Oliveira, *et al.*, 2024). Para alimentar o site, as informações são obtidas por pesquisa nas bases de dados Medline, PubMed, Embase, Cochrane Library, CINAHL, Scopus, Web of Science e LILACS. Estudos em andamento e dados não publicados também são incluídos nas revisões. Além dessas revisões sistemáticas, o site também se utiliza de dados oriundos do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) e do DATASUS, bem como por meio de parcerias com pesquisadores internacionais do estudo Global Burden of Disease (GBD) (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2023).

Em todo o Brasil, cerca de 14 milhões de pessoas apresentam alguma doença cardiovascular e, pelo menos, 400 mil morrem por ano, o que corresponde a cerca de 30% das mortes de brasileiros (Oliveira *et al.*, 2022).

2.1.2. Diabetes mellitus

Foi estimado que, em 2020, 9,3% dos adultos do mundo, entre 20 e 79 anos (463 milhões de pessoas) estariam com DM. Além disso, 1,1 milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos apresentariam DM tipo I. Em 2010, a projeção global do International Diabetes Federation (IDF) para o DM, em 2025, era de 438 milhões de pessoas.

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS (2024), o número de adultos vivendo com DM no mundo ultrapassou 800 milhões, mais que quadruplicando desde 1990, de acordo com novos dados de 2024 divulgados pelo periódico científico *The Lancet* no Dia Mundial do Diabetes (NCD-RisC, 2024) (OPAS, 2024). A análise conduzida pela NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), com apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), destaca a escala da epidemia de DM e a necessidade urgente de uma ação global mais coordenada para abordar tanto as

crescentes taxas da doença quanto as crescentes lacunas de tratamento, particularmente em países de baixa e média renda.

Para o Brasil, estimou-se uma prevalência de DM de 9,2%, variando de 6,3% na região Norte a 12,8% na região Sudeste. Dentre as complicações associadas ao DM, a neuropatia (3%) e a retinopatia (2%) são as mais frequentes. A região Norte apresentou os menores valores de complicações frente às demais regiões.

O Brasil é o sexto país em incidência de DM no mundo e o primeiro na América Latina, são 15,7 milhões de pessoas adultas com esta condição, e a estimativa é de que a doença alcance 23,2 milhões de adultos até 2045 (ADJ Diabetes Brasil, 2021).

2.1.3. Doenças renais

A insuficiência renal é uma condição na qual os rins perdem a capacidade de efetuar suas funções básicas. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia, a prevalência da doença renal crônica no mundo é de 7,2% para indivíduos acima de 30 anos e 28% a 46% para indivíduos acima de 64 anos. No Brasil, estima-se que mais de 10 milhões de pessoas tenham a doença (Ministério da Saúde, Biblioteca Virtual em Saúde, 2019).

Conforme Alcalde *et al.* (2018), no artigo intitulado “Gastos do Sistema Único de Saúde brasileiro com doença renal crônica”, foi divulgado o valor de R\$ 40 bilhões para os gastos do SUS em 2015 com os atendimentos de saúde de média e alta complexidade para a população brasileira, sendo que os gastos com a terapia renal substitutiva, ou seja, apenas com o tratamento da doença renal crônica no estágio 5, representaram mais de R\$ 2 bilhões, que correspondem a 5% dos gastos do SUS com média e alta complexidade, consumidos com parte do manejo de uma só doença, cuja incidência está aumentando.

2.2. ESPECTROFOTOMETRIA E CONTROLE DE QUALIDADE

2.2.1. Espectrofotometria

Existem atualmente métodos de dosagens de analitos sanguíneos por espectrofotometria e por fotometria de reflectância, sendo ambos os métodos

dependentes de produtos químicos ou de tiras reagentes para sua realização, o que encarecem a medição e despendem um tempo maior de processamento.

A maioria dos laboratórios de análises clínicas, senão todos, tanto governamentais como privados, utilizam a espectrofotometria como método padrão ouro para as determinações bioquímicas no sangue humano. Estes métodos são padronizados e as técnicas empregadas têm uma alta sensibilidade, permitindo uma alta acurácia dos valores, o que significa aproximação com os valores reais, uma alta precisão, que é a capacidade de repetir o mesmo exame obtendo valores muito próximos ou iguais, e alta exatidão, que corresponde ao valor real do analito estudado. Os métodos são referendados por controles de qualidade internos e externos.

Os métodos espectrofotométricos medem a concentração dos analitos sanguíneos mediante sua ligação com um composto químico específico inviabilizando a reutilização ou reanálise da amostra, cuja alíquota usada não pode ser testada novamente. A maioria dos métodos utilizados em bioquímica clínica envolve a determinação espectrofotométrica de compostos corados (cromóforos) obtidos pela reação entre o composto a ser analisado e o reagente (reagente cromogênico), originando um produto colorido. Os métodos que se baseiam nesse princípio são denominados genericamente de métodos colorimétricos, sendo específicos e muito sensíveis, quase todos utilizando luz visível para sua detecção.

Na espectrofotometria, componentes desconhecidos de uma solução podem ser identificados por seus espectros de absorção característicos ao ultravioleta, visível, ou infravermelho. Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitida. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorvedoras e do caminho óptico, sendo proporcional à concentração da substância analisada, conforme lei de Beer-Lambert (Lima, 2013).

O valor da concentração de muitos analitos sanguíneos em análises clínicas é obtido atualmente por meio de equipamentos espectrofotométricos automatizados, mediante a comparação da absorção de luz de determinado comprimento de onda decorrente da reação química entre um reagente e a molécula de interesse (analito). Como a absorção é proporcional à quantidade do analito presente na amostra, é possível obter o valor de sua concentração no sangue, sendo a espectrofotometria considerada uma técnica padrão ouro na área de análises clínicas.

A espectrofotometria é um método que estuda a interação da luz com a matéria, sendo usado para medir a intensidade de luz absorvida por uma substância química quando um feixe luminoso passa através de uma amostra, e que a partir desse princípio, permite a realização diversas análises qualitativas e quantitativas. A espectrofotometria pode ser utilizada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção e transmissão de luz que passa através da amostra.

Todo composto químico absorve, transmite, espalha ou reflete luz (radiação eletromagnética) em um determinado comprimento de onda, e isto pode ser usado para medir a concentração de uma substância conhecida, sendo que os componentes de uma solução podem ser identificados por seus espectros característicos no ultravioleta, visível ou infravermelho, decorrentes da radiação absorvida (absorbância). Já a transmitância explica a porção de energia luminosa que consegue atravessar uma determinada espessura de um material, sem ser absorvida, refletida ou espalhada.

A absorbância de uma solução está inversamente relacionada com a transmitância. Quando a absorbância de uma solução aumenta, a transmitância diminui, sendo grandezas complementares.

A espectrofotometria é uma técnica versátil e amplamente utilizada para a análise em diversas áreas como a química, física, biologia, bioquímica, engenharia de materiais, engenharia química e aplicações clínicas e industriais, usada para medir determinados ingredientes de uma droga, monitorar o crescimento bacteriano, ou diagnosticar um paciente com base na quantidade de analitos sanguíneos ou urinários. As análises podem ser qualitativas (identificação de uma substância desconhecida) e quantitativas (identificação da concentração da substância), já que cada substância pode transmitir, refletir, espalhar ou absorver a luz de forma diferente.

2.2.2. Controle de qualidade

A rotina laboratorial exige a utilização diária de controles de qualidade internos e externos como forma de garantir a veracidade dos resultados, tendo como objetivo a exatidão, a precisão, a reprodutibilidade e a repetibilidade dos ensaios, dos equipamentos e dos métodos utilizados. Os parâmetros utilizados para avaliar e

comparar metodologias incluem a correlação, a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivos e negativos (Lewis *et. al.*, 2012), reais e estimados, prevalência, precisão, classificação incorreta, e utilização do coeficiente Kappa na avaliação profissional (Sim *et. al.*, 2005).

De acordo com as normas regulatórias do Ministério da Saúde, presentes na Resolução RDC No. 166, de 24 de julho de 2017, da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, e na Resolução RDC No. 786, de 5 de maio de 2023 publicada pela mesma Agência, o controle interno da qualidade (CIQ) refere-se a procedimentos conduzidos em associação com o exame de amostras de pacientes de rotina para avaliar se o sistema analítico está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos (Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017; Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023). A avaliação envolve uso de controles que acompanham os reagentes utilizados na análise de cada analito para calibrar e validar o equipamento. Já o controle externo da qualidade (CEQ) é uma ferramenta de verificação do desempenho analítico do laboratório, através de ensaios de proficiência, análise de padrões certificados e comparações interlaboratoriais. Neste caso, são utilizadas amostras de soros sanguíneos padronizadas, analisados na rotina laboratorial junto com os soros dos pacientes do laboratório, cuja concentração é verificada posteriormente pelo órgão de controle a fim de demonstrar a confiabilidade dos resultados dos exames (Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ 1993, 1993; Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ 2023, 2023).

2.2.3. Controle de qualidade dos resultados analíticos do espectrofotômetro

O Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) preconiza ensaios de proficiência visando garantir a qualidade do laboratório clínico e permitir a comparabilidade dos resultados com outros congêneres, com foco na avaliação do desempenho em longo prazo. Há atualmente vários programas de CEQ, como o Sistema Nacional de Acreditação (SNA-DICQ), criado pela SBAC.

O CIQ consiste na introdução de amostras na rotina do laboratório para verificar se o sistema analítico (equipamento, reagente, calibrador, operador,

insumos) mantém sua estabilidade, dentro de limites e critérios previamente estabelecidos pelo laboratório. Ou seja, são amostras conhecidas que são processadas juntamente com as amostras de pacientes para validar a corrida analítica antes de liberar os resultados para os pacientes. O CIQ permite verificar a reprodutibilidade dos seus resultados ao longo do tempo. É uma ferramenta útil para avaliar imprecisão ou erro aleatório.

O CEQ é complementar ao CIQ. Permite que o laboratório avalie a veracidade ou o erro sistemático (no caso de múltiplas amostras) ou o erro total (resultado de uma amostra), por meio da comparação dos resultados obtidos no laboratório com valores definidos como verdadeiros.

O CEQ mais conhecido pela comunidade laboratorial é o ensaio de proficiência. Nesse caso, uma organização (provedor) independente envia amostras a um grupo de laboratórios e os resultados obtidos nos laboratórios participantes são avaliados estatisticamente. O provedor emite um relatório com os resultados do laboratório e os dados estatísticos dos grupos participantes. A média calculada dos resultados dos participantes representa o valor verdadeiro da análise.

O CEQ é um requisito necessário para os processos de creditações laboratoriais (ISO 15189, ISO 17025, PALC-SBPC/ML, DICQ-SBAC, etc.) e órgãos regulamentadores. Há vários provedores de CEQ, destacando-se o Departamento de Inspeção e Certificação da Qualidade (DICQ) que se expandiu e formou o SNA-DICQ; o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), a Organização Nacional de Acreditação (ONA) e o Colégio de Patologistas Americanos (College of American Pathologists – CAP), o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ-PRO-EX), e o Controle de Qualidade para Laboratórios (Controllab). O percentual dos laboratórios clínicos acreditados e certificados no Brasil, em 2022, foi de 2,3% (756 de um total de 33.170 laboratórios); destes, 418 (55,3%) são acreditados e certificados no SNA-DICQ; 175 (23,1%), no PALC; 152 (20,1%), na ONA e 11 (1,5%), no CAP (Pessoa *et al.*, 2022). Os inscritos no CEQ no Brasil representam 9083 (27,4%) sendo: 5583 (61,5%) no PNCQ (PRO-EX) e 3500 (38,5%) no Controllab (Pessoa *et al.*, 2022).

Os laboratórios participantes do PRO-EX do Controllab são classificados em Excelente, Bom, Regular e Ruim. Essa categorização é dada de acordo com o grau de acertos nos laudos das amostras-controle do CEQ. Esta classificação é baseada em cálculos estatísticos robustos, de acordo com o escopo do PNCQ. A

classificação Excelente é outorgada quando o laboratório participante atinge um percentual de acerto de 81 a 100%, Bom de 75 a 80%, Regular de 65 a 74%, e Ruim de 0 a 64%. Estes dados constam no Manual do Laboratório Participante (PNCQ 1993), editado pelo PNCQ, e estão de acordo com a Norma ABNT NBR ISO/IEC 17043/2011. Levando em consideração a classificação do PNCQ, somente um laboratório com qualificação Excelente está habilitado a emitir um laudo com os critérios de qualidade certificados.

O laboratório participante do PRO-EX recebe amostras de soro com concentrações pré-definidas e com valores dentro e fora da faixa de referência, para serem processadas junto com as amostras de trabalho. Recebe também os valores de aceitabilidade de resultados baseados no desvio padrão (DP) para cada analito, sendo que o PNCQ aceita uma faixa de valores de ± 2 DP para cada analito. Se o resultado obtido na espectrofotometria padrão ouro estiver dentro desses limites, o laboratório tem sua qualidade certificada.

Um parâmetro de qualidade do resultado fornecido por um espectrofotômetro é o coeficiente de variação (CV), uma medida de dispersão para relacionar o DP e a média aritmética (M) dos valores para cada analito em um conjunto de dados, sendo $CV\% = DP/M$. Quanto maior for seu valor, maior a variabilidade das informações em relação à média, o que indica um grupo de dados mais heterogêneo.

2.2.4. Técnica Raman

A técnica de espectroscopia Raman é baseada na interação da radiação eletromagnética incidente (feixe de laser) com uma molécula polarizada que espalha inelasticamente parte dos fótons (espalhamento Raman), carregando informações da energia vibracional das ligações químicas desta molécula (Parker, 1983; Barman *et al.*, 2012). Ao medir a distribuição de intensidade e comprimento de onda da luz espalhada inelasticamente (espectro Raman) em um espectrômetro, é possível obter informações sobre a estrutura química da substância irradiada, com a vantagem que uma aquisição espectral pode ser usada para determinar a concentração de vários analitos. É uma técnica de análise rápida, sem necessidade de adição de reagentes (“*label free*”), na qual não há necessidade de pré-tratamento da amostra biológica,

possibilitando obter informação de diagnóstico em tempo real com menor custo por exame.

A espectroscopia Raman tem se destacado como uma ferramenta promissora em análises clínicas, permitindo a identificação e quantificação de analitos de interesse em fluidos biológicos como soro humano e urina de forma rápida e não destrutiva (Qi e Berger, 2007). Sua capacidade de detectar biomoléculas com alta especificidade, sem necessidade de reagentes ou preparações complexas, torna-a uma alternativa atrativa para o monitoramento de marcadores bioquímicos, como glicose, lipídios, proteínas e metabólitos associados a diferentes doenças. A técnica tem tido avanços em sistemas portáteis e inteligência artificial, ampliando sua aplicação em diagnósticos “*point-of-care*”, o que abre a possibilidade de detecção precoce de patologias como DM (Dou *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1997), lesão renal (Rohleder *et al.*, 2004; Stosch *et al.*, 2005), câncer (Larsson *et al.*, 1974) e distúrbios metabólicos (Qu *et al.*, 1999; Rohleder *et al.*, 2004) a partir de pequena quantidade de material biológico.

2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

2.3.1. Fundamentos do espalhamento Raman

É muito importante compreender a interação de fótons com a matéria. Os fótons podem interagir com a matéria por absorção, ocorrendo a excitação de elétrons e/ou ionização do material, e podem interagir com a matéria via espalhamento.

A espectroscopia molecular vibracional, dada pelo espalhamento inelástico da luz incidente pela matéria, foi observada experimentalmente em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia e, por esse motivo, foi chamado de espalhamento Raman. O experimento foi realizado de tal forma que a incidência de luz solar focalizada em uma substância purificada produzia o espalhamento de fótons menos energéticos aos fótons incidentes. Para essa análise, entre a amostra e o feixe focalizado de luz solar era colocado um filtro azul, ou seja, apenas a radiação azulada (de mais alta energia da região do espectro visível) era transmitida e incidia na amostra. Raman adicionou um filtro amarelo logo após o filtro azul e antes da amostra (em série com o azul) de tal forma que toda a radiação

eletromagnética incidente foi bloqueada. Após isso, Raman esperava que se colocasse o filtro amarelo após a amostra a radiação ainda deveria ser bloqueada, pois se tratava de um líquido transparente que passara por diversas purificações. Porém quando o filtro era colocado após a amostra, ele observou a presença de faixas azuladas-esverdeadas transmitidas através do filtro amarelo. Na Figura 1 é mostrado um desenho esquemático simplificado dos componentes de um espectrômetro Raman.

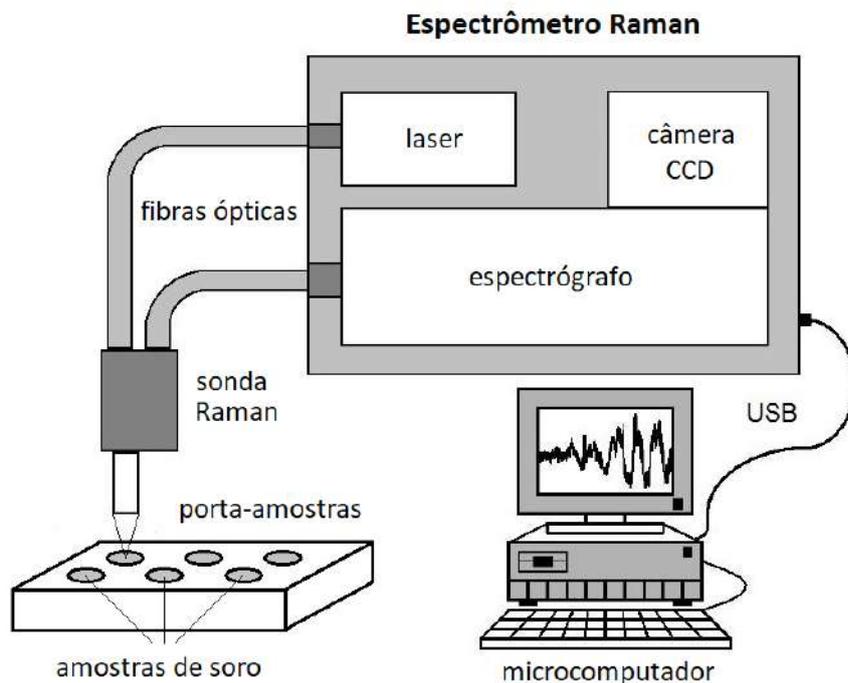


Figura 1 – Desenho esquemático simplificado de um espectrômetro Raman típico.

Assim, poderiam existir duas possibilidades: na primeira, o líquido continha impurezas que fluoresciam quando a luz incidia sobre a amostra, ou na segunda, estava ocorrendo de alguma maneira um espalhamento inelástico da luz que incidia na amostra, e, conseqüentemente, sintonizando parte da luz incidente em comprimentos de onda maiores (menos energéticos). O experimento foi feito em mais de 80 líquidos diferentes e devidamente purificados, o que comprovou o espalhamento inelástico da luz, chamado hoje de espalhamento Raman.

O conceito da espectroscopia Raman vibracional é baseado no espalhamento inelástico da radiação incidente sobre a amostra que se deseja estudar. Quando um fóton de frequência ν incide em uma amostra líquida

devidamente purificada, existem duas possibilidades. Na primeira, o fóton incidente pode ser espalhado elasticamente pela molécula e conseqüentemente preservar a mesma energia do fóton; este fenômeno é conhecido como espalhamento Rayleigh. Na segunda, o fóton incidente pode ser espalhado pelo material de forma inelástica, sendo possível ocorrer de duas maneiras: espalhamento Stokes e anti-Stokes, onde o fóton espalhado pode ser menos ou mais energético do que o fóton incidente, respectivamente, conforme mostrado na Figura 2.

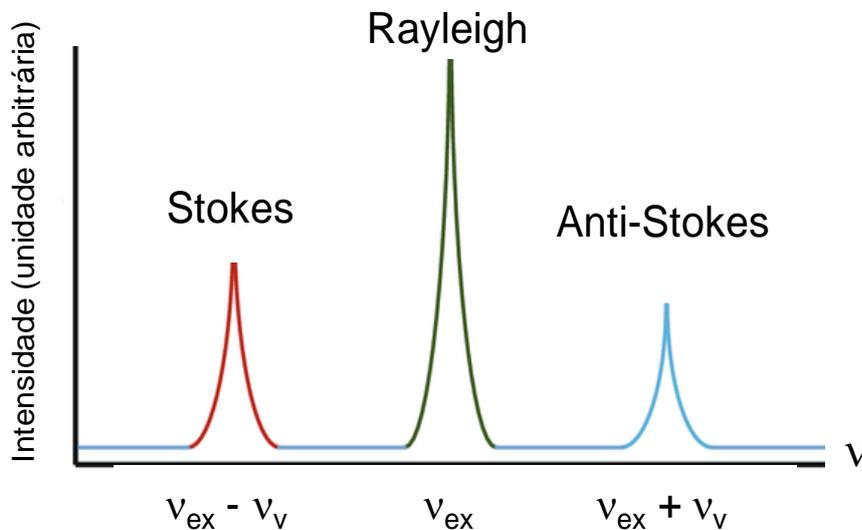


Figura 2 – Gráfico representativo para as frequências Stokes e anti-Stokes. A frequência central está relacionada ao espalhamento elástico (Rayleigh).

Ainda, no espalhamento Raman, existe uma característica na intensidade do fóton espalhado, ou seja, as linhas anti-Stokes tendem a apresentar uma intensidade de pico inferior às linhas Stokes, ilustrado na Figura 2. Isso se dá devido ao fato de que a população de moléculas nos níveis vibracionais fundamentais mais energéticos é menor em relação aos níveis vibracionais menos energéticos, que representam as linhas Stokes.

A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados, ter informação sobre a geometria molecular, sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente, entre outras informações. É por esse motivo que essa ferramenta é tão poderosa, permitindo inclusive a diferenciação de polimorfos, isto é, substâncias que, apesar de terem a mesma

fórmula química, tem diferentes estruturas espaciais e, portanto, diferentes propriedades.

Como não há somente um tipo de vibração, uma vez que geralmente as espécies químicas presentes em um composto ou molécula são complexas, a radiação espalhada inelasticamente é constituída por um número muito grande de diferentes frequências (ou componentes espectrais) as quais precisam ser separadas e ter sua intensidade medida. O gráfico que representa a intensidade da radiação espalhada (eixo vertical – grandeza chamada de intensidade de espalhamento, dada em unidade arbitrária) em função de sua energia (eixo horizontal – grandeza chamada de número de onda, dada em cm^{-1}) é chamado de espectro Raman. Cada espécie química, seja um pigmento, corante, substrato, aglutinante, veículo ou verniz, fornece um espectro, que é como sua impressão digital (ver exemplos na Figura 3), permitindo sua identificação inequívoca ou, por exemplo, a detecção de alterações químicas decorrentes de sua interação com outras substâncias ou com a luz (Faria, 2011)

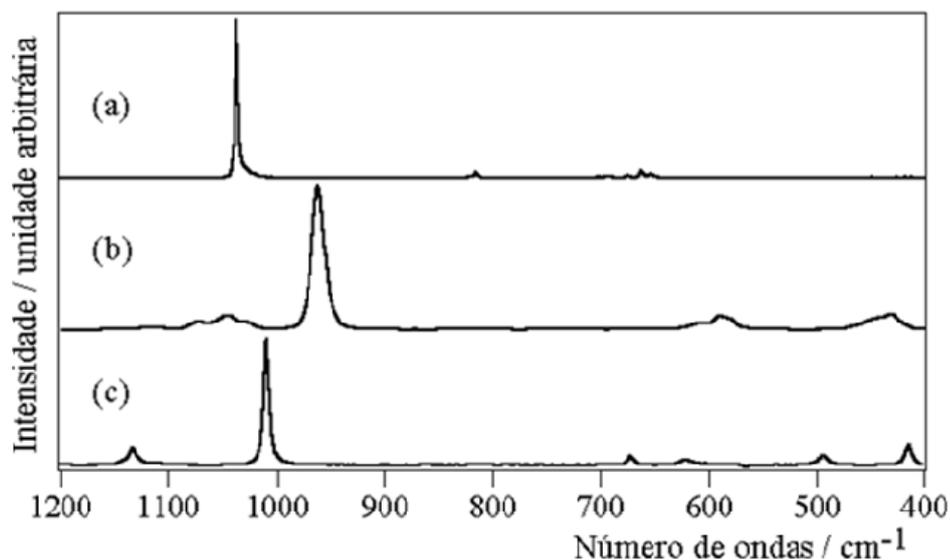


Figura 3 – Exemplo do uso da espectroscopia Raman na identificação de substâncias. Os espectros mostrados são todos de pigmentos brancos: (a) branco de chumbo (carbonato de chumbo); (b) branco de ossos (fosfato de cálcio) e (c) gipsita (sulfato de cálcio hidratado). Fonte: Faria, 2011.

A espectroscopia vibracional mede a interação da radiação eletromagnética com os movimentos de vibração de um sistema molecular, proporcionando como resposta um espectro vibracional, o qual fornece uma informação importante da

composição química da amostra, sendo muito usado em análises químicas de diversos materiais (Li *et al.*, 2014).

Estas técnicas de espectroscopia vibracional utilizam espectros de absorção da luz na região do infravermelho e de espalhamento inelástico da luz (espectroscopia Raman). O infravermelho médio (IVM) e o infravermelho próximo (IVP) são regiões do espectro eletromagnético nos quais ocorrem os modos vibracionais em sistemas moleculares e cristalinos (Wang *et al.*, 2016). A Tabela 1 apresenta características, instrumentação e aplicações dos processos ópticos citados anteriormente, juntamente com as informações referentes à espectroscopia de fluorescência.

Tabela 1 – Comparação entre as diversas técnicas espectroscópicas úteis em avaliação molecular.

Técnica	Características	Instrumentação	Aplicações
Espectroscopia no infravermelho médio (IVM)	Espectroscopia de absorção	Fontes policromáticas, IVM	Aplicações farmacêuticas e agrícolas, química médica, ciência dos alimentos, microbiologia, ciência dos materiais
	Modos fundamentais de vibração	Interferômetro, filtro	
Espectroscopia no infravermelho próximo (IVP)	Restrição em amostra líquida	Detector de infravermelho	Química médica, tomografia de IVP, controle de processos industriais, qualidade da água, ciência dos materiais
	Espectroscopia de absorção	Fontes policromáticas, IVP interferômetro, grade de difração, CCD, PMT	
	Sobretons e combinações		
Espectroscopia Raman	Quimiometria		Produtos farmacêuticos e cosméticos, geologia e mineralogia, caracterização de materiais semicondutores, ciências da vida, qualidade da água, química médica, ciência dos materiais
	Espectroscopia de espalhamento	Fonte monocromática, UV, visível, IVP	
	Modos fundamentais de vibração molecular	Grade de difração, interferômetro, CCD, PMT	
Espectroscopia de fluorescência	Baixa intensidade		Análise bioquímica e biomédica de amostras orgânicas, imagem do tempo de vida da fluorescência, ciência dos materiais
	Espectroscopia de emissão	Fonte monocromática, UV, Grade de difração, filtro, CCD, PMT, APD, SPAD	
	Presença de fluoróforos		

CCD – “*charge-coupled device*” ou dispositivo de carga acoplada; PMT – “*photomultiplier tube*” ou tubo fotomultiplicador; APD – “*avalanche photodiode*” ou fotodiodo de avalanche; SPAD – “*single-photon avalanche diode*” ou diodo de avalanche de fóton único.

Existem outros processos ópticos de absorção e espalhamento, respectivamente, representados pelas técnicas de absorção no infravermelho e

espalhamento Raman, citados na Tabela 1. A luminescência é um processo de emissão espontânea da luz por átomos em estados excitados, que quando comparado à técnica do infravermelho, pode ser utilizado no visível em relação aos detectores e lentes. Esta técnica não é utilizada para explorar modos vibracionais, lembrando que a espectroscopia Raman também pode utilizar a excitação no visível. As técnicas de fotoluminescência e quimiluminescência também têm aplicações nos campos farmacêuticos, biológicos, ambiental e industrial.

Tanto a espectroscopia no infravermelho quanto a Raman podem fornecer informações importantes sobre a composição e a complexidade de amostras biológicas. As primeiras aplicações do infravermelho foram limitadas aos materiais vegetais secos e produtos relacionados, devido ao forte momento dipolar da água, que causa absorção da radiação nessa faixa de comprimento de onda. Já com o desenvolvimento de métodos como a espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), o uso de ambas as técnicas foi impulsionado, pois houve o aprimoramento da relação sinal-ruído e a diminuição do tempo de aquisição espectral, possibilitando novas aplicações desses métodos.

Os métodos de análise por infravermelho são mais utilizados para matéria vegetal seca ou não aquosa. Sendo que a água tem fracas propriedades de espalhamento Raman, este método tem sido mais estudado para a matéria vegetal e animal fresca, "*in-situ*", e também "*in vitro*", não destrutivamente.

Ao contrário da espectroscopia FT-IR, que investiga mudanças nos momentos dipolares, a espectroscopia Raman investiga as mudanças na polarizabilidade das ligações moleculares quando excitadas por uma onda eletromagnética, que é a capacidade para formar dipolos instantâneos a partir do campo elétrico da luz incidente, determinando a resposta dinâmica de um sistema ligado a campos externos e fornecendo informações sobre a estrutura interna de uma molécula.

A interação da luz com uma molécula pode induzir à deformação de sua nuvem eletrônica que, por essa mudança, dá origem aos modos ativos na espectroscopia Raman. As moléculas que contêm ligações entre átomos homonucleares, como as de carbono-carbono, enxofre-enxofre e nitrogênio-nitrogênio, sofrem uma mudança na polarizabilidade quando fótons interagem com elas, sendo a tendência da matéria, quando submetida a um campo elétrico externo, de adquirir um momento de dipolo elétrico em proporção ao campo externo aplicado. Quando sujeitos a um campo elétrico,

os elétrons carregados negativamente e os prótons dos núcleos atômicos carregados positivamente estão sujeitos a forças opostas e sofrem separação de cargas.

Como o espalhamento Raman tem menor intensidade que a absorção por infravermelho, as amostras contendo baixa concentração do analito podem não serem detectadas corretamente. Por isso, outras técnicas como a ressonância Raman e a espectroscopia Raman de superfície ampliada (“*surface enhanced Raman spectroscopy*” – SERS) vêm sendo estudadas por resultarem em uma melhora significativa de sensibilidade (Baranska, 2014).

A espectroscopia Raman é uma técnica que usa uma fonte de luz monocromática que, ao atingir a matéria, é espalhada por ela, emitindo luz de mesma energia (espalhamento elástico) ou de energia diferente da incidente (espalhamento inelástico). No primeiro caso, o espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh) não é de interesse. No segundo caso, o espalhamento inelástico (espalhamento Raman), é possível obter informações importantes sobre a composição química do composto a partir dessa diferença de energia. A Figura 4 mostra esquematicamente as possibilidades existentes para o espalhamento da luz ao incidir sobre a matéria.

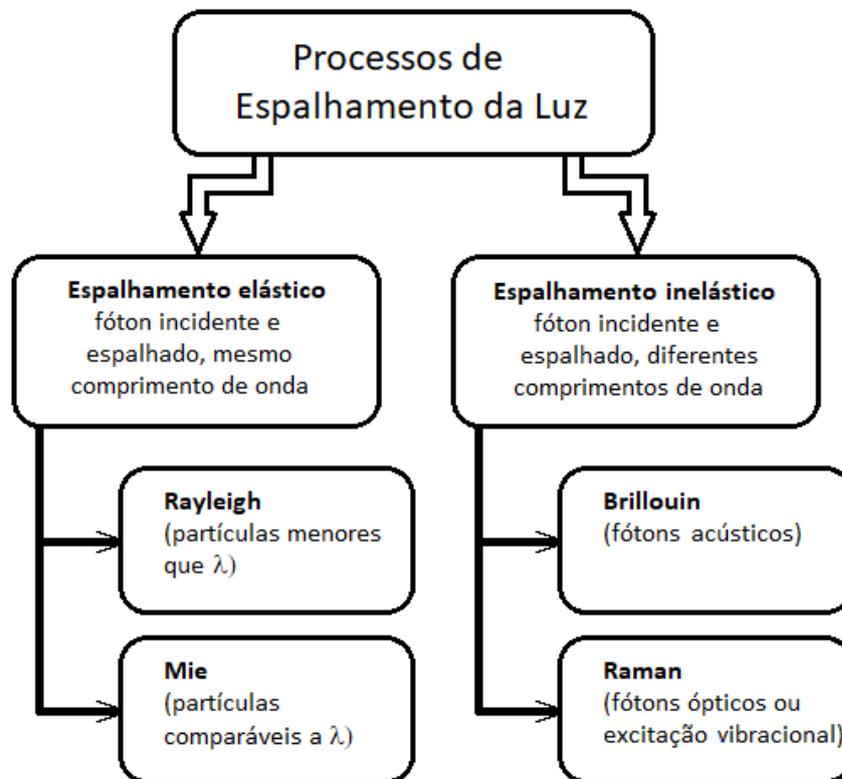


Figura 4 – Processos de espalhamento da luz incidente sobre a matéria.

Conforme o trabalho de Guedes e Moreira (2022), a vibração molecular refere-se ao movimento dos átomos quando o centro de massa da molécula está fixo. Se os átomos se aproximam ou afastam, mas no mesmo eixo, o movimento é denominado de vibração molecular, se a molécula se desloca para um lado ou para o outro, diferente da direção do eixo, o movimento é de translação, e se a molécula gira rigidamente em torno de seu eixo de massa, mantendo fixas as distâncias entre os átomos, o movimento é de rotação, conforme mostrado na Figura 5.

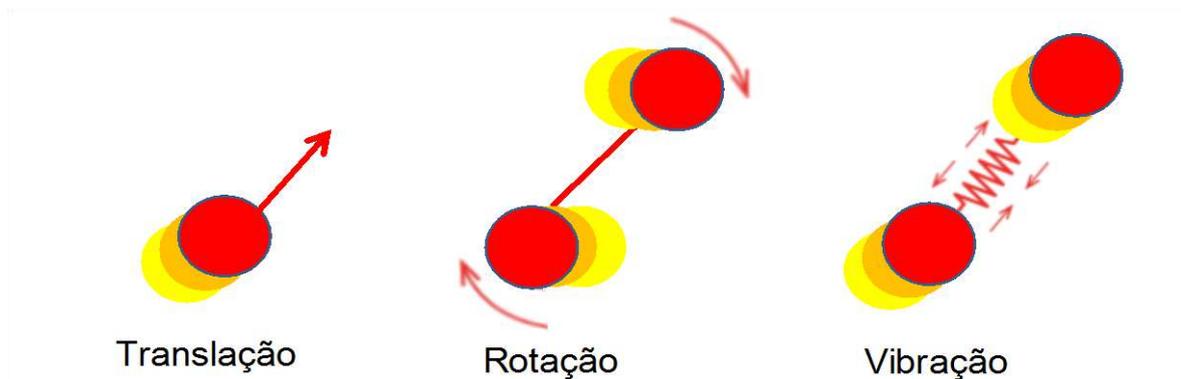


Figura 5 – Três possíveis estados de movimentação de uma molécula.

Existem três possibilidades distintas de translação, uma para cada direção no espaço tridimensional, e três de rotação, cada uma em torno de um dos três eixos que se cruzam no centro de massa da molécula, conforme mostrado nas Figuras 6 e 7. (Claro, 2018)

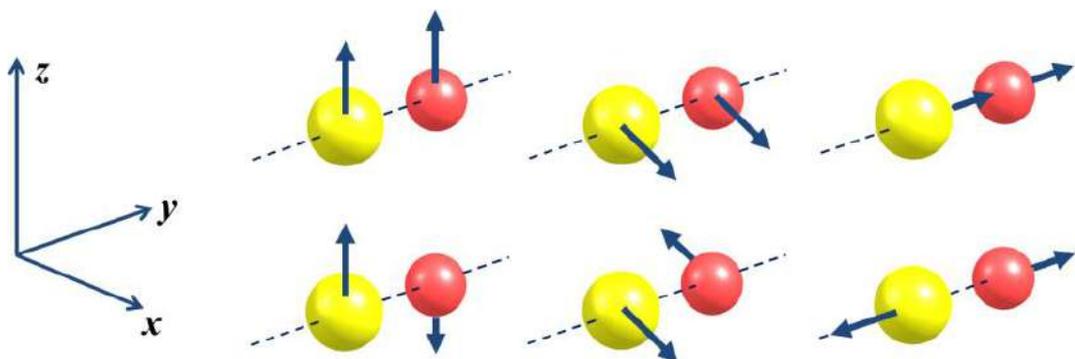


Figura 6 – Estado translacional de uma molécula, nas três direções permitidas. Fonte: Claro, 2018.

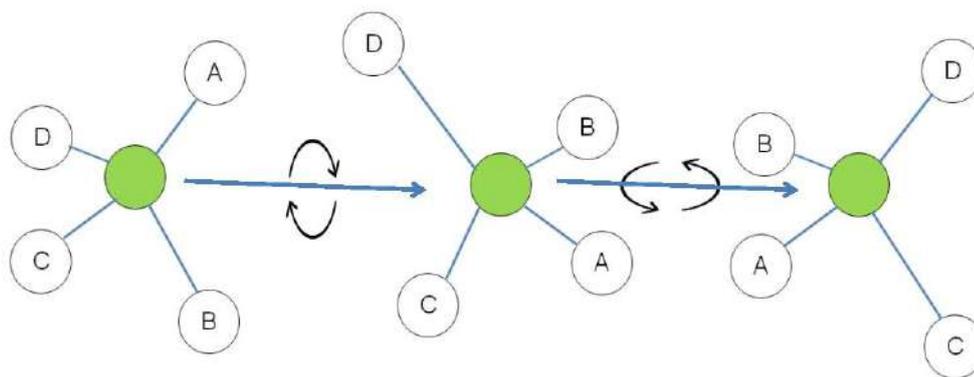


Figura 7 – Estado rotacional de uma molécula, nas três direções permitidas.

Para calcular quantas vibrações são possíveis para uma molécula, basta multiplicar o número de átomos que a constituem por 3, obtendo assim o número de graus de liberdade, que é o menor número de coordenadas independentes necessárias para definir a posição de todas as partes de um sistema vibratório, conforme mostrado na Tabela 2. Desse número subtrai-se 6, que são os 3 movimentos de translação e os 3 de rotação. O que resulta é o número de vibrações possíveis, tanto de rotação como de translação. Por exemplo, a molécula de água (H_2O) possui 3 átomos. Logo, tem $3 \times 3 = 9$ graus de liberdade. Então, tem $9 - 6 = 3$ maneiras distintas de vibrar. A Figura 8 representa os três modos possíveis de vibração de uma molécula de água. O primeiro é chamado de modo de estiramento simétrico (Figura 8a), o segundo de modo de estiramento assimétrico (Figura 8b) e o terceiro de modo de variação angular (Figura 8c). Pode-se observar que o centro de massa da molécula (átomo de oxigênio), que deve estar um pouco acima dos átomos de hidrogênio, fica fixo, enquanto os átomos de hidrogênio se deslocam.

Tabela 2 – Exemplos de graus de liberdade em várias moléculas.

Graus de liberdade de várias moléculas				
Molécula	Tipo	Translação	Rotação	Total (N)
1 átomo	He, Ar, Ne, Kr	3	0	3
2 átomos	H_2 , N_2 , O_2 , CO , Cl_2	3	2	5
3 átomos	H_2O , CH_2 , SO_2	3	3	6

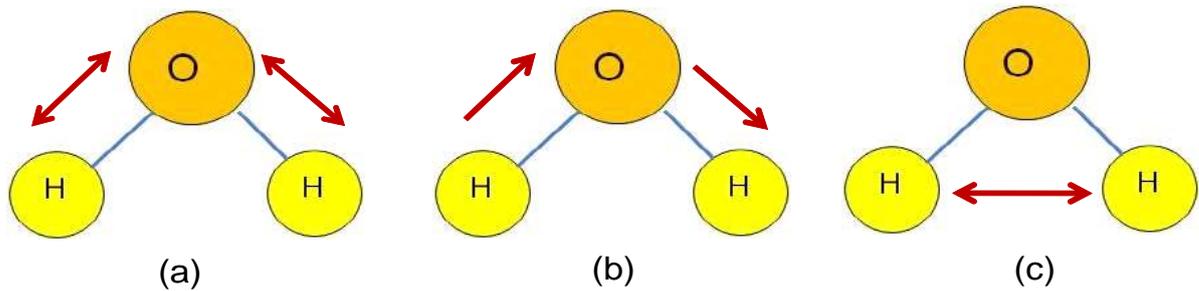


Figura 8 – Possíveis vibrações da molécula de água. (a) modo de estiramento simétrico, (b) modo de estiramento assimétrico e (c) modo de variação angular.

2.3.2. Interação da luz com as vibrações moleculares

Quando uma molécula é excitada por uma energia de algum agente excitador, seus átomos podem adquirir movimentos diversos, mostrando que esses movimentos são combinações dos modos normais de vibração. Como cada modo normal de vibração tem uma energia própria, conhecendo quais são esses modos e quais são suas energias, sabe-se como a molécula pode interagir com os agentes excitadores.

O modo normal de vibração de uma molécula só tem dois estados ou níveis de energia possíveis. O mais baixo corresponde à uma molécula no estado fundamental, com energia $E_0 = 0$. O outro nível corresponde à energia E_1 que a molécula tem quando está vibrando em um de seus modos normais, mas para observar esse nível de energia é necessário excitá-la para este nível E_1 , mediante a incidência de um fóton sobre a mesma, sendo suficiente que este fóton tenha uma energia E_f igual à diferença de energia entre os níveis excitado e fundamental, isto é, $E_f = E_1 - E_0$, conforme mostrado na Figura 9A (Guedes; Moreira, 2022). Nesse caso, o fóton pode ser absorvido pela molécula e desaparecer. As vibrações moleculares costumam absorver fótons que pertencem à região do infravermelho no espectro.

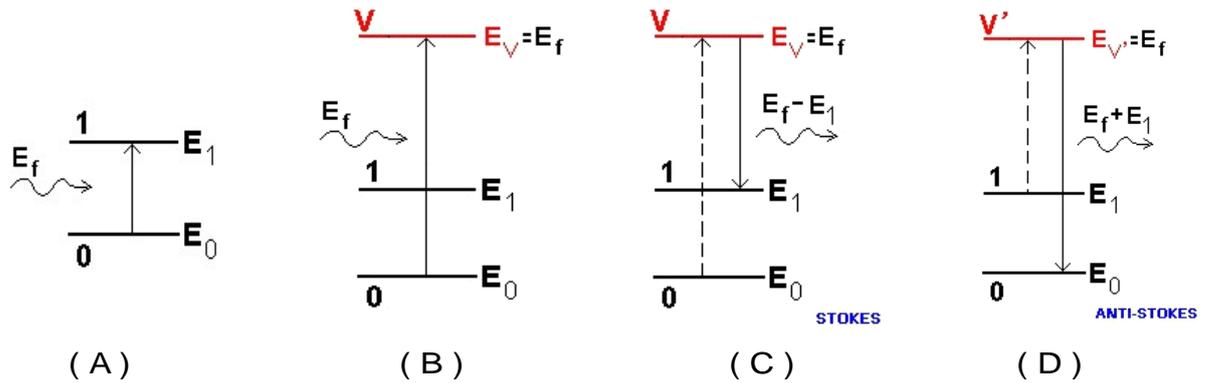


Figura 9 – (A) Diagrama de Jablonskii com o desenho esquemático de excitação de uma molécula do estado fundamental E_0 para o estado excitado E_1 pelo fornecimento de energia E_f . (B) Elevação do elétron ao nível de energia virtual E_V por um fóton que possui a mesma energia que a diferença de energia entre os dois níveis, $E_V = E_f$. (C) Fóton espalhado inelasticamente com energia menor, $E_V - E_1$. (D) Fóton espalhado com energia maior, $E_V + E_1$. Fonte: Guedes; Moreira, 2022.

No caso do espalhamento Raman, o fóton incidente tem uma energia E_f muito maior que a energia E_0 do modo fundamental. Ao incidir sobre a molécula, o fóton pode excitá-la a um estado virtual cuja energia E_V é muito maior do que a energia do modo de vibração E_1 . Em geral, essa excitação é eletrônica, do tipo encontrada no caso do modelo do átomo de Bohr, que o descreve como um núcleo pequeno carregado positivamente e rodeado por elétrons em órbitas circulares. Sendo esses estados excitados muito instáveis, a molécula decai rapidamente para estados de menor energia, podendo, por exemplo, voltar ao estado fundamental E_0 , reemitindo um fóton com a mesma energia do fóton incidente, em uma direção que pode ser diferente da direção que tinha antes. Para todos os efeitos, o fóton incidente foi espalhado, sem perder sua energia inicial, constituindo o espalhamento Rayleigh, conforme mostrado na Figura 9B.

Há casos em que a molécula não retorna ao estado fundamental. Depois de decair, ela permanece no estado vibracional com energia E_1 . Nesse caso, o fóton que é reemitido em uma direção qualquer, terá sua energia diminuída para $E_f - E_1$, constituindo um tipo de espalhamento Raman denominado Stokes, conforme mostrado na Figura 9C.

Existe ainda outra possibilidade de decaimento, quando a molécula pode já estar vibrando com energia E_1 no momento que o fóton incide sobre ela, levando-a a um estado de energia virtual bem mais alta $E_{V'}$. Desse estado $E_{V'}$, a molécula decai, só que nesse caso para o estado fundamental E_0 . No processo, um fóton de energia

$E_f + E_1$ é emitido, constituindo outro tipo de espalhamento Raman denominado anti-Stokes, conforme mostrado na Figura 9D.

Quem provoca vibração molecular, mesmo antes que as moléculas recebam a radiação de excitação, é a agitação térmica. O ambiente onde se encontra a amostra troca calor (energia) com as moléculas, podendo ocorrer excitação de seus modos normais de vibração, e podem produzir o espalhamento Raman anti-Stokes. Normalmente, em uma amostra à temperatura ambiente, o número de moléculas que estão no estado fundamental é muito maior que o de moléculas excitadas termicamente, por isso, o número de fótons com espalhamento Stokes é maior que o número de fótons com espalhamento anti-Stokes.

Ao medir a distribuição de intensidade e comprimento de onda da luz espalhada inelasticamente, é possível deduzir informações sobre a energia vibracional da substância irradiada, o sinal Raman, que ao ser detectado pelo espectrômetro, permite a sua identificação.

Atualmente a espectroscopia Raman é considerada uma técnica dentre as mais modernas, na qual não há necessidade do pré-tratamento ou preparação da amostra analisada, já que possui um sistema mais rápido de análise, não gera resíduo, possui custo baixo e pode produzir diagnóstico em tempo real.

Técnicas de processamento dos espectros baseada em análise de componente principal ("*principal component analysis*" – PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais ("*partial least squares*" – PLS) podem ser utilizadas para classificar ou agrupar os espectros de um conjunto de amostras baseado nas diferenças espectrais relacionadas com a diferença na composição química das amostras, e correlacionar variáveis quantitativas com informações de concentrações provenientes de técnicas padrão ouro.

2.3.3. O espalhamento Raman e a absorção no infravermelho

Para saber como uma molécula pode absorver luz infravermelha, pode-se analisar uma molécula simples de ácido clorídrico (HCl), representando o átomo de cloro pelo círculo maior e o átomo de hidrogênio pelo círculo menor, conforme mostrado na Figura 10. Quando um feixe de luz infravermelha com três frequências ou energias diferentes incide sobre a molécula em seu estado fundamental, se uma dessas três frequências coincidir com a frequência de um dos modos normais de vibração da

molécula, essa componente da luz será absorvida, transferindo sua energia para a molécula, que passa a vibrar com maior amplitude. As outras componentes passam sem modificação, mas para acontecer essa absorção, além dessa coincidência de frequência (ou energia), é necessário que a luz induza a formação de um momento de dipolo elétrico na molécula, ou, se a molécula já tiver um momento de dipolo anterior, a vibração precisa fazer esse momento de dipolo variar.

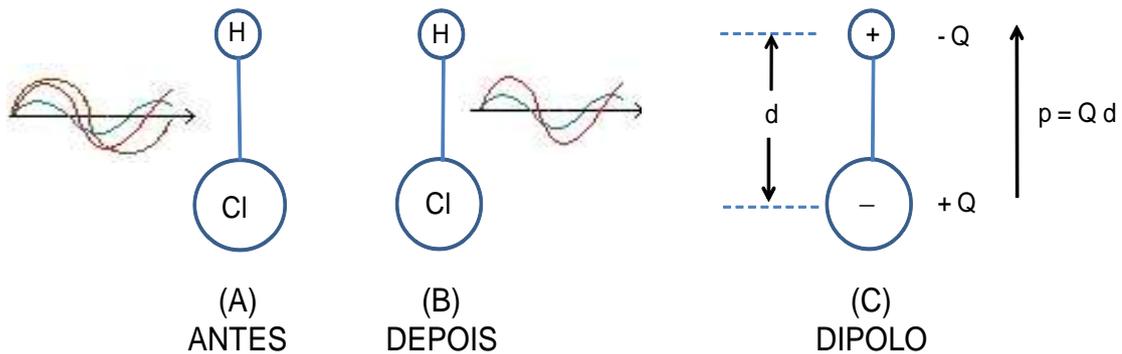


Figura 10 – Molécula de HCl (A) antes e (B) depois de receber energia de três frequências diferentes de um feixe de luz infravermelha, e seu momento de dipolo (C).

Um momento de dipolo elétrico é um sistema com duas cargas iguais em valor, uma positiva e outra negativa, separadas por uma pequena distância. No caso da molécula de HCl, uma carga positiva se acumula mais perto do átomo de cloro e uma carga negativa perto do átomo de hidrogênio, tendo um dipolo elétrico p , medido pelo produto de uma das cargas, Q , pela distância entre elas, d . O momento de dipolo é representado por uma seta na direção da carga negativa para a positiva, um vetor \mathbf{p} , conforme mostrado na Figura 10C.

O campo elétrico da luz incidente pode interagir com as cargas e deslocá-las, variando o momento de dipolo em sintonia com o comprimento de onda da luz, sendo que a interação entre o campo elétrico da luz e a vibração da molécula promove a troca de energia com a absorção do fóton. Ou seja, para haver absorção da luz incidente, a vibração deve variar o momento de dipolo da molécula.

O caso do espalhamento Raman, o efeito do campo elétrico é um pouco mais sutil. O momento de dipolo da molécula pode ser gerado ou modificado pelo campo elétrico da luz incidente, sendo que quanto maior for o campo, maior será o momento de dipolo p , segundo a expressão $p = \alpha.E$, onde α representa a polarizabilidade e mede

a disposição da molécula a ter momento de dipolo induzido. Para haver efeito Raman, a polarizabilidade deve variar durante a vibração molecular.

Considerando uma molécula de gás carbônico, CO_2 , que não tem momento de dipolo já que as cargas negativas e positivas, apesar de separadas, têm o mesmo centro, é observado um modo de vibração do tipo estiramento simétrico que não afetaria seu estado basal, portanto não gera momento de dipolo e não absorve a luz incidente.

Porém, o campo elétrico da luz incidente pode induzir um momento de dipolo, já que as cargas negativas da molécula (elétrons) são deslocadas de sua posição de equilíbrio, que varia com a frequência da vibração enquanto interage com um campo elétrico de frequência mais alta, conforme mostrado na Figura 11. O dipolo oscilante afeta a amplitude da onda de luz, fazendo com que essa amplitude flutue com a frequência da vibração, sendo que a onda foi “modulada” pela variação do dipolo. Parte da energia da luz é perdida na interação, constituindo o caso de espalhamento Stokes. O caso de espalhamento anti-Stokes ocorre se a amplitude for aumentada pela vibração já existente do dipolo da molécula.

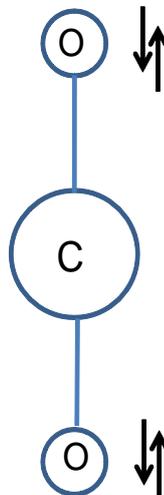


Figura 11 – Desenho esquemático do momento de dipolo do CO_2 com estiramento simétrico.

Para ilustrar o resultado de uma experiência Raman, a seguir é analisado o espectro do tetracloreto de carbono (CCl_4), que tem a forma espacial de um tetraedro com o átomo de carbono no centro e os átomos de cloro nos vértices. Como essa molécula tem 5 átomos, o número de modos normais de vibração, como já visto, deve ser $5 \times 3 - 6 = 9$ modos de vibração. A Figura 12 mostra 4 dos modos de vibração desta molécula e as linhas Raman associadas a eles. A energia E

indicada no deslocamento Raman, corresponde à energia transferida pela luz do laser pela vibração, e é proporcional ao inverso de comprimento de onda λ , calculado pela fórmula $E = h \cdot \nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência da radiação, ou também $E = h \cdot c / \lambda$, onde c , representa a velocidade da luz, λ é o já citado comprimento de onda da radiação.

Os 4 picos observados na Figura 12 correspondem aos 9 modos de vibração do CCl_4 , mas observam-se apenas 4 modos normais de vibração devido à degenerescência, que é a existência de diferentes modos normais de transição apresentando a mesma energia, ou seja, tendo a mesma frequência e, em consequência, a mesma posição no espectro, como acontece por exemplo com o pico de 770 cm^{-1} , que corresponde ao modo de estiramento assimétrico, e representa o conjunto de 3 modos de vibração que só diferem pela orientação espacial dos movimentos dos átomos mas que possuem a mesma energia, assim como acontece com outros modos e com outras substâncias.

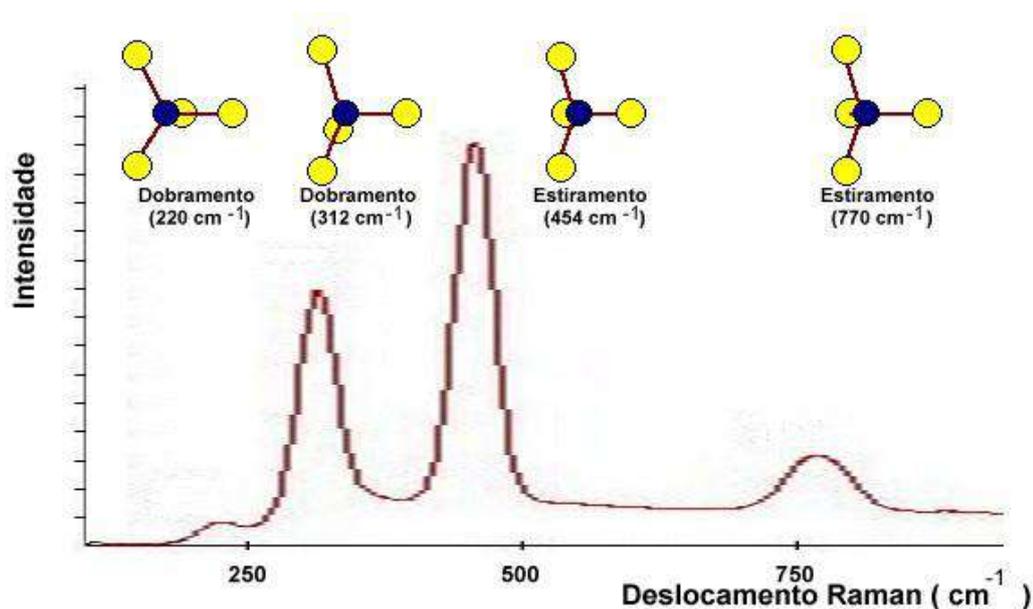


Figura 12 – Modos de vibração da molécula de CCl_4 mostrando 4 dos 9 picos, sendo que o pico em 770 cm^{-1} é constituído por 3 modos de vibração que possuem a mesma energia e portanto coincidem na mesma faixa espectral. Fonte: Guedes; Moreira, 2022.

Quando existe qualquer tipo de transição, seja ela eletrônica, rotacional, vibracional ou vibriônica (transição simultânea entre estados eletrônicos e vibracionais), existem as regras de seleção. Essas regras basicamente dirão quais

são as transições possíveis a partir de um nível de energia inicial. No caso da espectroscopia Raman, a regra de seleção mais geral é que, quando é aplicado um campo elétrico à molécula, esta deve possuir além de um momento de dipolo induzido quando um campo elétrico interage com a mesma, e deve apresentar variação na sua polarizabilidade durante a vibração.

Em geral as vibrações moleculares possuem valores de energia conhecidos e característicos, e com isso pode-se determinar a composição de uma substância qualquer observando o espectro Raman (energias vibracionais) e relacionando o mesmo com as principais ligações químicas que compõem a substância. A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de frequências Raman para diferentes ligações químicas e em quais substâncias essas composições são encontradas geralmente, e a Tabela 4 mostra a frequência Raman para alguns analitos sanguíneos (Dingari *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2015; Giansante *et al.*, 2021).

Tabela 3 – Posição do pico Raman característico para os grupos funcionais das diferentes ligações químicas.

Posição do pico (cm ⁻¹)	Ligação	Grupos funcionais
3500 – 3300	Estiramento N–H	Aminas primárias e secundárias
3500 – 3200	Estiramento O–H	Alcoóis (banda forte e larga)
3300 – 2500	Estiramento O–H	Ácidos (banda larga sobreposta à banda de alongação C–H)
≈ 3300	Estiramento C–H	Alcinos
3100 – 3000	Estiramento C–H	Alcenos e aromáticos
3000 – 2850	Estiramento C–H	Alcanos
2840 – 2690	Estiramento C–H	Aldeídos
2250 – 2100	Estiramento C≡H	Alcinos
1760 – 1665	Estiramento C=O	Cetonas, aldeídos, ésteres e ácidos
1680 – 1630	Estiramento C=C	Alcenos
1600 – 1500	Estiramento C=C (anel aromático)	Aromáticos
1600 – 1300	Estiramento N–O	Compostos nitroílo
1300 – 970	Estiramento C–O	Alcoóis, ésteres e ácidos
1250 – 1000	Estiramento C–N	Aminas

Tabela 4 – Posição dos picos Raman característicos para alguns analitos bioquímicos de interesse.

Posição do pico (cm ⁻¹)	Tipos / analitos
1675	Colesterol
1660	Ácidos graxos saturados
1525	Carotenoides
1465	Lipídios; colesterol
1450	Proteínas (albumina)
1440	Ácidos graxos saturados e insaturados; colesterol
1375	Glicose
1300 e 1305	Ácidos graxos saturados e insaturados
1265 e 1270	Ácidos graxos saturados
1160	Carotenoides
1135	Ácidos graxos saturados
1130	Glicose
1085	Ácidos graxos insaturados
1065	Ácidos graxos saturados; glicose
1004	Proteínas (albumina); ureia
919	Glicose
877	Ácidos graxos insaturados
859	Glicose
846	Creatinina
702	Colesterol
681	Creatinina
608	Colesterol
555	Colesterol
520	Glicose
426 e 436	Colesterol

O espectro Raman contém informações similares às de um espectro de absorção no infravermelho (FTIR), como mostrado na Figura 13 (espectros da 2-etinilpiridina), apesar da natureza dos fenômenos físicos serem diferente (espalhamento no caso da espectroscopia Raman e absorção no caso do FTIR).

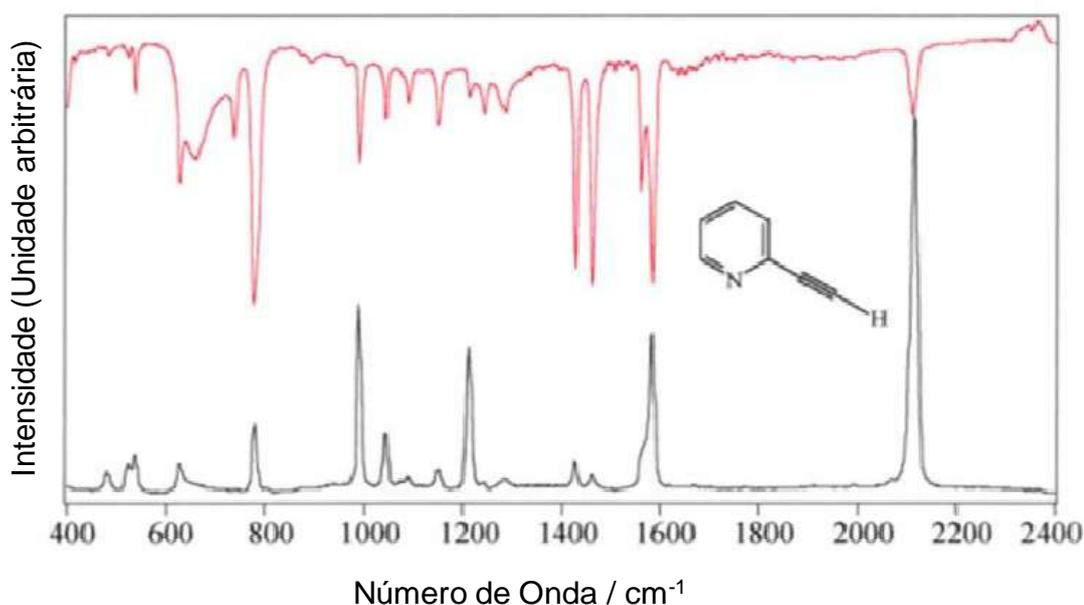


Figura 13 – Comparação dos espectros de absorção no infravermelho (FTIR, linha superior) e Raman (linha inferior) da 2-etinilpiridina. Fonte: Faria, 2011

Já que as moléculas orgânicas podem ter uma tendência maior de fluorescer quando uma radiação de comprimento de onda menor (ultravioleta e visível) é utilizada, as fontes de excitação monocromática de comprimento de onda maior, como os diodos laser em estado sólido que produzem luz a 785 e 830 nm, são normalmente utilizadas.

É importante determinar que tipo de espectro é mais compatível com o material a ser analisado para não incorrer em erros de interpretação. Por exemplo, se deve usar a espectroscopia Raman nos casos em que a investigação de ligações de carbono em anéis alifáticos e aromáticos forem de interesse primário; quando houver ligações que são difíceis de enxergar no FTIR, ou seja O–O, S–H, C=S, N=N, C=C, etc.; quando a avaliação de partículas em solução for importante, como no polimorfismo; quando modos de baixa frequência forem importantes, como nos óxidos inorgânicos; quando reações em meio aquoso forem investigadas; quando reações nas quais a observação por meio de uma janela de reação for mais fácil e mais segura, como reações catalíticas de alta pressão e polimerizações; quando a investigação dos modos de rede de baixa frequência for de interesse; e na investigação da inicialização e do ponto final da reação e da estabilidade do produto de reações bifásicas e coloidais.

Da mesma forma, deve se escolher a espectroscopia FTIR quando se deseja estudar reações de fase líquida; nas reações em que os reagentes, solventes e espécies da reação apresentem fluorescência; nas ligações com mudanças fortes de dipolo forem importantes, como C=O, O-H, N=O; nas reações em que os reagentes e reagentes estão em concentrações baixas; nas reações em que as bandas de solvente são fortes em Raman e podem sobrecarregar o sinal de espécies fundamentais; e nas reações em que os intermediários formados são ativos no infravermelho.

A análise por espectroscopia Raman é feita sem necessidade de preparações ou manipulações de qualquer natureza, como pulverização por exemplo. Quando a amostra é muito grande, ela pode ser examinada através de um sistema especial de lentes ou através de fibras ópticas. Atualmente são comercializados tanto microscópios Raman dedicados quanto equipamentos convencionais que podem ter o microscópio como acessório, e em ambos os casos, a utilização de fibras ópticas é um recurso importante quando o objeto analisado é muito grande para caber no compartimento de amostras ou quando a amostra pode ser avaliada remotamente, com dificuldade de transporte até o laboratório.

Outro aspecto importante é a possibilidade de exploração de alguns efeitos especiais, como o efeito Raman ressonante e o SERS, que é uma técnica que aumenta a intensidade do sinal Raman através da adsorção de moléculas em substratos metálicos nanoestruturados como nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs), sendo utilizada principalmente em detecção de toxinas, esporos de bacilos, análise de vestígios químicos, diagnósticos médicos e ciência dos materiais, ou quando os compostos estão presentes em quantidades muito pequenas (Stosch *et al.*, 2005; Van Duyne *et al.*, 2006; Baranska, 2014).

2.3.4. Espectroscopia Raman aplicada à quantificação de analitos séricos e metabólitos sanguíneos

Vários trabalhos publicados sobre espectroscopia Raman *in vivo*, em alguns tecidos do corpo humano, ou em sangue total ou o soro, urina e outros fluidos biológicos, mostram resultados acerca da análise *in situ*, através de sondas intracorpóreas para a detecção de tumores ou outras patologias, e análises *in vitro*. Bratchenko *et al.* (2012) relataram o diagnóstico *in vivo* de câncer de pele com base

na implementação de uma configuração de um espectrômetro portátil combinando análise de espectros Raman e de autofluorescência na região do infravermelho próximo (800-915 nm). Gaba *et al.* (2022) descreveram técnicas ópticas para a visualização de espécies biológicas dentro de matrizes complexas, incluindo biópsias, ressecções de tecidos e biofluidos. Em seu trabalho, as aplicações da espectroscopia Raman no câncer de próstata incluem análise de biópsia, avaliação de margens cirúrgicas e monitoramento da eficácia do tratamento.

Uma das primeiras pesquisas utilizando a espectroscopia Raman com excitação em 514,5 nm em plasma humano foi realizado em 1974 por pesquisadores do Hospital Lipid Chemistry Laboratory and Sahlgren's, da Universidade de Göteborg, na Suécia (Larsson *et al.*, 1974). Os autores observaram intensas bandas de espalhamento Raman em 1160 e 1520 cm^{-1} nas amostras de plasma de pacientes saudáveis, e atribuíram as bandas a sistemas conjugados por ressonância de vibrações de alongamento em ligações simples C–C e duplas C=C. Os autores também observaram o plasma de pacientes que haviam sido diagnosticados com algum tipo de doença (várias formas de infecções bacterianas, virais e fúngicas, e várias formas de câncer) e descobriram que a análise dos dados de espectroscopia Raman e os dados de fluorescência de fundo, com máximos de fluorescência na região espectral entre 542 e 648 nm, os espectros apareceram alterados de uma maneira regular em várias doenças como erisipela, micose fungóide, hepatite viral, sepse, leucemia e carcinoma avançado com metástases e diferentes sítios primários. Em 1976, pesquisadores dos Laboratórios Merck, Sharp and Dohme Research, Nova Jersey, Estados Unidos (Rein *et al.*, 1976) sugeriram que baixos níveis sanguíneos de β -caroteno, licopeno e xantofila dão origem a bandas Raman de ressonância aumentada destes compostos no plasma sanguíneo humano com excitação a 514,5 nm, cuja diferença com o soro é a presença de anticoagulantes.

Na metade da década de 1990, Dou *et al.* (1996) obtiveram espectros Raman de alta qualidade a partir de glicose no plasma e no soro, amostras biológicas fortemente fluorescentes, pelo uso da aberração cromática de uma lente. A concentração de glicose nesses materiais foi estimada pela intensidade da banda em 1130 cm^{-1} devido ao modo de alongamento C–O. Após adicionar glicose artificialmente ao plasma e ao soro, os pesquisadores usaram a intensidade de uma banda em 1135 cm^{-1} para estimar a concentração de glicose, obtendo coeficiente de correlação (r) de 0,993 e 0,991, com limites de detecção de 45 mg/dL e 50 mg/dL no

plasma e no soro, respectivamente. A partir deste momento, houve um grande esforço por muitos grupos de pesquisa para avaliar metabolitos plasmáticos em concentrações fisiológicas utilizando espectroscopia Raman.

Berger *et al.* (1997) demonstraram a concentração de glicose em sangue total humano usando espectroscopia Raman no infravermelho próximo acoplada a fibra óptica, em amostras fisiológicas com glicose acima dos níveis normais (glicose adicionada). A análise dos espectros por regressão PLS foi usada para prever as concentrações de glicose, obtendo valores de r igual a 0,99 e erro de previsão (raiz do erro quadrático médio da validação cruzada – “*root mean square error of cross-validation*” – RMSEcv) igual a 36,0 mg/dL.

Pouco depois, Berger *et al.* (1999) investigaram amostras de sangue humano de 66 doadores individuais para estudar concentrações de metabólitos relevantes como de glicose, colesterol, triglicérides, ureia, proteínas totais e albumina, assim como calcular os hematócritos e a fração de glóbulos vermelhos em relação ao sangue total, com o auxílio de um modelo de regressão multivariado baseado em PLS aplicado a espectros Raman com excitação a 830 nm. No estudo, foram obtidos espectros em soro e sangue total, utilizando um laser de diodo no infravermelho próximo (830 nm) para gerar espectros em 60 s, que continham superposições de sinais Raman de diferentes analitos, e usando a validação cruzada por PLS, obtiveram os resultados de $r = 0,91; 0,91; 0,94; 0,86; 0,88$ e $0,93$, com RMSEcv = 26,0; 12,0; 29,0; 3,8; 0,19 e 0,09 mg/dL para glicose, colesterol, triglicérides, ureia, proteínas totais e albumina, respectivamente. Neste estudo, os pesquisadores removeram macropoteínas que mascaravam características sutis em seus analitos.

No mesmo ano, Qu *et al.* (1999) coletaram espectros Raman em um espectrômetro holográfico de estágio único com excitação em 785 nm para prever as concentrações de alguns analitos (proteínas totais, albumina, triglicérides e glicose), obtendo-se erros de predição da concentração valores entre 1 e 10%. Foram medidas da mesma maneira as concentrações de drogas terapêuticas e substâncias de abuso (paracetamol, etanol e codeína) em solução aquosa, e os erros dos testes Raman para paracetamol e etanol foram inferiores aos níveis tóxicos no soro humano, sendo que a sensibilidade para detecção de codeína não atingiu o nível tóxico. Assim como no estudo de Berger *et al.* (1999), os

pesquisadores também removeram macroproteínas que mascaravam características sutis em seus analitos.

Rohleder *et al.* (2004) usaram espectros Raman de amostras de soro puro e soro ultrafiltrado em uma investigação utilizando amostras de 247 doadores de sangue, com a obtenção de espectros com 12 aquisições de 25 s cada para o soro puro e 5 aquisições de 60 s para o soro ultrafiltrado. No estudo, as concentrações de glicose, triglicérides, ureia, proteínas totais, colesterol, lipoproteínas de alta densidade, lipoproteínas de baixa densidade e ácido úrico, em diferentes parâmetros de soro puro e em ultrafiltrado sérico, foram determinadas com precisão clínica aceitável. Um algoritmo multivariado para análise de dados por PLS foi treinado utilizando 148 amostras, e as concentrações para as restantes 99 amostras de soro foram previstas com base apenas nos espectros Raman, com erros relativos de predição em torno de 12%. A ultrafiltração reduziu eficientemente a fluorescência de fundo, o que permitiu melhorar a precisão da previsão, de modo que o coeficiente de variação relativa foi reduzido em um fator mais de 2 para os analitos glicose e ureia no soro ultrafiltrado quando comparado ao do soro puro.

Stosch *et al.* (2005) aplicaram SERS com excitação de 514,5 nm para determinar a concentração de creatinina, no soro, adicionando creatinina marcada isotopicamente ($2\text{-}^{13}\text{C}$, $2,3\text{-}^{15}\text{N}_2$) como padrão interno, obtendo 87 espectros de amostras de soro comercial liofilizado e reconstituído, usando um coloide de nanopartículas de prata como substrato SERS. O desempenho de previsão do modelo de regressão por PLS foi posteriormente validado com relação aos valores reais, resultando em um desvio padrão inferior a 2%. As previsões das concentrações de creatinina sérica ficaram dentro de 3% de erro comparativamente aos valores obtidos por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. A concentração de creatinina no modelo PLS sem qualquer pré-processamento do espectro mostrou um erro de previsão de 1,3%. Quando foi aplicado um filtro tipo correção de espalhamento multiplicativo (multiplicative scatter correction – MSC), usada para corrigir efeitos de espalhamento de luz causados por diferenças no tamanho e na forma das partículas em espectroscopia por refletância, o erro de previsão caiu para 0,3%.

Van Duyne *et al.* (2006) desenvolveram sensores de antraz e glicose baseados em SERS usando substrato de filme de prata sobre nanoesferas (AgFON) em esporos de *Bacillus subtilis*, em lugar de *Bacillus anthracis*, que são mais

patogênicos. O biomarcador de esporos de bacilos, o dipicolinato de cálcio, foi extraído eficientemente dos esporos e rapidamente detectado pelo SERS com limite de detecção de $\sim 2,6 \times 10^3$ esporos, abaixo da dose infecciosa de antraz de 10^4 esporos, em um tempo de 11 minutos. Para a detecção de glicose em plasma bovino, uma camada de partição mista de decanotiol/mercaptohexanol foi usada como sensor para detectar a glicose adsorvida pela superfície do substrato AgFON, para ser quantificada. A raiz do erro quadrático médio de previsão (“*root mean square error of prediction*” – RMSEP) foi 83,16 mg/dL (4,62 mM), com 85% dos pontos de validação caindo dentro da faixa A e B da grade de erro de Clarke.

Qi e Berger (2007) mediram as concentrações de analitos em amostras de soro sanguíneo e urina usando espectroscopia Raman de fibra óptica de núcleo líquido (LCOF), utilizada para aumentar a intensidade do sinal coletado. Espectros Raman foram adquiridos na região do infravermelho próximo, com excitação de 830 nm, usando fibra de teflon de 30 cm, com diâmetros internos e externos de 600 e 800 micrometros, com volume inferior a 0,1 mL e potência de excitação de 160 mW na entrada da fibra LCOF. Os espectros de 71 amostras de soro sanguíneo e 61 amostras de urina foram analisados através de PLS com relação aos valores de concentração obtidos pelo método espectrofotométrico (padrão ouro). Foi encontrada correlação significativa entre as concentrações previstas versus as concentrações de referência para os compostos químicos testados (glicose, ureia, creatinina, HDL, LDL, colesterol, triglicérides, albumina e globulinas). O uso de LCOF melhorou o sinal Raman coletado de uma amostra líquida límpida, a qual foi colocada dentro de um tubo fino de baixo índice de refração, sendo dessa forma toda a amostra excitada, melhorando a relação sinal/ruído (RSR).

Stokes *et al.* (2008) relataram um estudo baseado em SERS usando vários comprimentos de onda de excitação (514,5, 632,8 e 785 nm) aplicados em soluções aquosas de ácido fólico usando nanopartículas de prata que foram sintetizadas pela redução da prata por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), com hidróxido de sódio, usando nitrato de prata para obter o coloide. O ácido fólico (vitamina B9) está envolvido em muitos processos biossintéticos e está relacionada a processos de doenças, como certos defeitos congênitos. Este estudo mostrou o potencial para a detecção espectroscópica Raman quantitativa, com resultados ótimos para a excitação no verde (514,5 nm), que alcançou o melhor resultado. A SERS abre uma série de possibilidades tanto na área clínica quanto no ambiente laboratorial. A

aplicação de ácido fólico como conjugado para direcionar molécula para terapias anticancerígenas é um passo importante na ação de medicamentos. É possível confirmar a presença do conjugado de ácido fólico em uma célula usando microscopia confocal, mas a aplicação da SERS permitiu quantificá-lo dentro deste ambiente e monitorar a absorção pelas células, minimizando o risco de fotodissociação e aumentando a biocompatibilidade.

Bergholt e Hassing (2009) adquiriram primeiramente, o espectro Raman de proteína C reativa (PCR) em uma solução aquosa tamponada usando excitação no infravermelho próximo (785 nm) com potência de 14 mW para evitar efeitos térmicos e danos à amostra, e tempo de aquisição espectral de 59 s por amostra na faixa de 200 a 2000 cm^{-1} . Posteriormente, a concentração de PCR foi medida no plasma sanguíneo de 40 indivíduos, com valores conhecidos de concentração pelo método de imunoturbidimetria. As predições quantitativas da PCR foram feitas por meio da regressão PLS e da análise de intervalos de mínimos quadrados parciais (IPLS). A semelhança das características espectrais presentes no vetor de regressão PLS com o espectro Raman do PCR ilustrou que a previsão é sensível à informação molecular transportada pela luz espalhada Raman. O algoritmo IPLS foi aplicado para otimizar o modelo de calibração para uma precisão mais próxima da clínica, demonstrando a viabilidade do uso da espectroscopia Raman para medições quantitativas de PCR no plasma sanguíneo. Os resultados da validação cruzada da regressão PLS em relação aos valores imunoturbidimétricos de referência foram de $r = 0,87$ e $\text{RMSEcv} = 37,5 \text{ mg/dL}$, sendo o valor do RMSEcv relativamente alto e indicando que o modelo tem baixa capacidade de previsão. Usando o modelo IPLS, os resultados foram $r = 0,98$ e $\text{RMSEcv} = 10,8 \text{ mg/dL}$.

Considerando que a concentração de ácido láctico no estado fisiológico é demasiado baixa para ser detectada com espectroscopia Raman tradicional, Hsu e Chiang (2010) aplicaram SERS mediada por nanopartículas de prata coloidal, com excitação de 632.8 nm e 20 mW de potência, para identificação e quantificação rápidas do ácido láctico. A intensidade da banda de 1395 cm^{-1} nos espectros SERS padrão de ácido láctico foi definida e foi realizada a análise de várias concentrações, entre 0,3 e 2 mM ($R^2 = 0,99$), sendo que a ultrafiltração do plasma (valor de corte de 5 kDa) reduziu eficientemente a fluorescência de fundo para melhorar o desempenho da SERS. Após estes estudos, os autores concluíram que o limite confiável da concentração de ácido láctico em solução aquosa é aproximadamente

$5,5 \times 10^{-2}$ M. A espectroscopia Raman não é capaz de detectar níveis de estado fisiológico de ácido láctico em 1×10^{-3} a 22×10^{-3} M em sangue.

Dingari *et al.* (2012) utilizaram o método de pré-concentração do sangue, obtida por deposição de gotas de sangue em um substrato e evaporação da água, e demonstraram que a glicação da albumina do soro leva a mudanças sutis, porém consistentes, nas características vibracionais da molécula, que com técnicas de classificação multivariada podem ser usadas para discriminar a albumina glicada da variante não glicada com 100% de precisão, evidenciando alto poder preditivo, mesmo em concentrações substancialmente mais baixas do que as normalmente encontradas na prática clínica. O estudo também demonstrou potencial para a determinação simultânea dos níveis de hemoglobina glicada e não glicada, abrindo a possibilidade para a quantificação do estado de glicação de proteínas no desenvolvimento biofarmacêutico, bem como para a determinação de marcadores glicêmicos em diagnósticos clínicos de rotina.

Em outro estudo, Poon *et al.* (2012) evitaram a etapa de remoção de proteínas concentrando o plasma como gotas secas em lâmina, quantificando o fibrinogênio e obtendo resultados comparáveis ao ensaio tradicional de fibrinogênio (método de Clauss). Amostras de 34 pacientes foram analisadas por espectroscopia Raman e os espectros resultantes foram ajustados com um modelo de regressão por PLS usando valores alvos obtidos através de um ensaio de fibrinogênio de Clauss pré-calibrado. Um RMSEP de $72,0 \pm 5$ mg/dL foi alcançado com apenas 25 espectros.

Uskokovic-Markovic *et al.* (2013), em uma revisão de literatura, descreveram que as técnicas de espectroscopia Raman permitem uma rápida e simultânea identificação e/ou determinação da concentração de vários parâmetros bioquímicos, como glicose, acetona, creatinina, uréia, perfil lipídico, ácido úrico, proteína total, etc., com um limite muito baixo de detecção, podendo também ser aplicada em caracterização de moléculas e células, bem como diagnósticos de aterosclerose em estágio inicial. A técnica Raman pode ser aplicada a todos os tipos de amostras (fluidos e tecidos “*in vitro*”), o que simplifica o diagnóstico de inúmeras doenças e estados patológicos, especialmente para monitoramento de glicose e diagnóstico de câncer.

Borges *et al.* (2015) identificaram as diferenças espectrais relacionadas com os componentes lipídicos como colesterol, triglicérides, lipoproteínas de baixa e alta

densidade (LDL e HDL) e glicose em 44 amostras de soro, por espectroscopia Raman em 830 nm e 250 mW de excitação, e tempo de integração de 50 s. A PCA discriminou as amostras de soro com glicose, colesterol e triglicerídeos alterados comparativamente ao soro com concentrações de referência (normal) com base nas diferenças na concentração desses compostos, submetidos previamente à análise bioquímica por colorimetria, com resultado de precisão de 70% para glicose, de 77% para colesterol, de 81% para triglicérides, de 59% para HDL e de 60% para LDL, evidenciando o potencial da técnica Raman para ser empregada como meio de diagnóstico em análises clínicas.

Almeida *et al.* (2016) desenvolveram um modelo espectral baseado em PLS para correlacionar as concentrações de ureia e creatinina em soro de 55 pacientes normais e 47 pacientes com doença renal crônica realizando tratamento de hemodiálise, através da espectroscopia Raman com excitação de 830 nm, usando as concentrações bioquímicas avaliadas pelo método colorimétrico como concentrações reais da amostra. A PCA foi usada para discriminar pacientes em diálise de indivíduos normais, resultando em 95% de precisão na classificação. O modelo PLS mostrou $r = 0,97$ e $0,93$, e $RMSE_{cv} = 17,6$ e $1,94$ mg/dL, para ureia e creatinina, respectivamente.

Seguindo o estudo de Borges *et al.* (2015), Silveira *et al.* (2017) desenvolveram um modelo quantitativo baseado em PLS para estimar a concentração de compostos bioquímicos séricos como glicose, triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL, respectivamente), utilizando os espectros Raman (830 nm, 250 mW, 50 s) de 44 amostras de soro sanguíneo com concentrações determinadas previamente por colorimetria. O modelo PLS baseado na abordagem de validação cruzada tipo “deixe um de fora” (“*leave-one-out cross-validation*”) estimou a concentração de triglicerídeos e colesterol, obtendo-se $r = 0,98$ e $0,96$, e $RMSE_{cv}$ de $35,4$ e $15,9$ mg/dL, respectivamente. Os autores destacaram que estes resultados sugerem a possibilidade da espectroscopia Raman ser empregados como meio de diagnóstico em análises clínicas de rotina. Para os demais analitos bioquímicos, o valor de r variou de $0,75$ a $0,86$.

Atkins *et al.* (2017) publicaram uma revisão da literatura no período de mais de quatro décadas sobre a exploração da espectroscopia Raman na detecção e análise de componentes sanguíneos, como glóbulos vermelhos, glóbulos brancos,

plaquetas, soro, plasma e de sangue total, sugerindo que a técnica pode ser útil em aplicações que vão desde a compreensão da oxigenação da hemoglobina até a discriminação de células cancerígenas versus linfócitos saudáveis, e a investigação forense de cenas de crime, reunindo os estudos publicados de espectroscopia Raman de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, plasma e sangue total, concluindo que é possível distinguir estados saudáveis e doentes através de espectroscopia Raman não invasiva mediante análise multivariada.

Parachalil *et al.* (2019) aplicaram a espectroscopia Raman em soro sem e com ultrafiltração para detectar, separar e concentrar as frações de proteínas de alto peso molecular (albumina e gamaglobulinas) assim como frações séricas de baixo peso molecular como ureia e glicose, e quantificar, usando análise multivariada por PLS, para obter parâmetros como coeficiente de determinação (R^2) e RMSEcv, aplicando um algoritmo de correção de sinal multiplicativo estendido (EMSC) aos espectros brutos para remover o sinal de fundo da água e os interferentes espectrais como o β -caroteno, demonstrando que a espectroscopia Raman é uma alternativa viável e/ou adjuvante à prática clínica atual para a análise paralela de frações de alto e baixo peso molecular, e análise simultânea de múltiplos analitos na fração de baixo peso molecular, para aplicações diagnósticas no soro humano.

Correia *et al.* (2020) identificaram as diferenças nos espectros Raman de amostras de soro com valores normais e alterados de antígeno prostático específico (PSA) correlacionando essas diferenças por meio de técnicas multivariadas PCA e PLS em 321 espectros de 108 pacientes (270 espectros obtidos de 91 amostras de PSA não alterado e 51 espectros de 17 amostras com PSA alterado). A análise discriminante por PCA mostrou poder preditivo de 85,7% (sensibilidade de 87,41% e especificidade de 76,47%). A análise discriminante por PLS mostrou um poder preditivo de 92,8%, uma sensibilidade quase perfeita (98,51%) e uma especificidade intermediária (62,75%). O modelo quantitativo por regressão PLS mostrou uma boa correlação entre os valores de PSA e as características espectrais ($r = 0,605$) sugerindo que a espectroscopia Raman pode ser eficientemente utilizada para triagem de pacientes com PSA alterado, bem como para acompanhamento do tratamento do câncer de próstata pela medição do PSA ao longo do tratamento, utilizando inicialmente a regressão PLS para identificar a possível presença do câncer de próstata (maior sensibilidade) e posteriormente a PCA para confirmar o diagnóstico (alto poder preditivo).

Giansante *et al.* (2022) avaliam o perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos e colesterol HDL), compostos nitrogenados não proteicos (ureia e creatinina) e glicose por espectroscopia Raman em 242 amostras de soro humano, em espectrômetro de bancada, desenvolvendo modelos para discriminar e quantificar as amostras utilizando a concentração predita por modelo de regressão quantitativa baseado em PLS versus a concentração por espectrofotometria (padrão ouro). O erro analítico para a validação cruzada “deixe um de fora” com base na concentração prevista pelo PLS foi de 10,5, 21,4, 13,0, 4,9, 0,21 e 15,4 mg/dL para colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL, ureia, creatinina e glicose, respectivamente. O coeficiente Kappa indicou concordância muito boa para colesterol (0,83), boa para triglicerídeos (0,77), uréia (0,70) e creatinina (0,66) e regular para colesterol HDL (0,38) e glicose (0,30), demonstrando que a espectroscopia Raman pode ser considerada uma metodologia importante para rastrear a população, especialmente para triglicerídeos e colesterol séricos.

González-Viveros *et al.* (2022) propuseram um método não invasivo para quantificar HbA1c e glicose *in vivo* por espectroscopia Raman e redes neurais artificiais do tipo “*feed-forward*” (FFNN), sendo que os espectros foram obtidos do antebraço, punho e dedo indicador de 46 indivíduos, alcançado um erro no modelo preditivo de 0,69% para HbA1c e 30,12 mg/dL para glicose. Os pacientes foram classificados de acordo com os valores de HbA1c em três categorias: saudáveis, pré-diabetes e diabéticos. O método proposto obteve especificidade e sensibilidade de 87,5% e 80,8%, respectivamente, demonstrando o benefício do uso de redes neurais artificiais e técnicas de seleção de recursos para melhorar o processamento de espectros Raman e assim determinar a concentração de hemoglobina glicada e de glicose em pacientes com diabetes não diagnosticada.

Espectrômetros Raman portáteis, miniaturizados e modelos “*handheld*” vêm sendo utilizados na área de diagnóstico médico. Bratchenko *et al.* (2021) utilizaram espectrômetro Raman miniatura para diagnóstico *in vivo* de câncer de pele (617 casos de neoplasias cutâneas em 615 pacientes, sendo 70 melanomas, 122 carcinomas basocelulares, 12 carcinomas espinocelulares e 413 tumores benignos) com base na implementação de uma configuração de espectrômetro portátil de baixo custo que combina a obtenção de espectros Raman e autofluorescência da amostra na região do infravermelho próximo (800-915 nm). Cada amostra foi histologicamente examinada após biópsia excisional. Os espectros foram

classificados entre neoplasmas benignos e malignos por análise discriminante empregando a regressão por PLS (PLS-DA). Para verificar a estabilidade dos modelos de classificação, foram realizadas 10 validações cruzadas. A área sob a curva característica de operação do receptor (area under the receiver-operating characteristic curve – ROC AUC), que é um gráfico que mostra a taxa de verdadeiros positivos em relação à taxa de falsos positivos em diferentes pontos de corte do modelo, foi empregada para avaliar o desempenho dos modelos de classificação em aprendizado de máquinas. Os valores de ROC foram de 0,75 (0,71-0,79; intervalo de confiança de 95%), para tumores malignos e benignos; 0,69 (0,63-0,76; intervalo de confiança de 95%), para melanomas e tumores pigmentados e 0,81 (0,740,87; intervalo de confiança de 95%) para melanomas e ceratose seborreica. Os valores preditivos positivo e negativo variaram de 20% a 52% e de 73% a 99%, respectivamente. A razão de biópsia variou de 0,92:1 a 4,08:1 (em níveis de sensibilidade de 90% a 99%), sendo a precisão da análise automática com o sistema proposto comparável ou menor à precisão de dermatologistas treinados.

Khristoforova *et al.* (2023) relataram o uso do mesmo espectrômetro miniatura e mesma metodologia que os utilizados por Bratchenko *et al.* (2021) para detecção e classificação de 127 pacientes com insuficiência cardíaca crônica (ICC) e 57 voluntários saudáveis, pelo estudo da espectroscopia Raman portátil (785 nm) da pele *in vivo*, detecção esta baseada nas mudanças das características espectrais associadas às alterações na composição bioquímica dos tecidos cutâneos. No total, 202 espectros de pele de pacientes com ICC e 90 espectros de pele de voluntários saudáveis foram classificados, e a ROC AUC foi avaliada em 0,89, utilizando 10 validações cruzadas para verificar a estabilidade do modelo.

Yang *et al.* (2024) relataram o uso de um espectrômetro Raman portátil com algoritmos de aprendizado de máquina para obter diagnóstico preciso de câncer de esôfago *in vitro*, com resultados de acurácia muito bons em determinar as margens de tumores em espécimes de dissecação cirúrgicas. Foram usados cinco métodos de classificação baseados em aprendizado de máquina, incluindo os algoritmos dos K vizinhos mais próximos (“*K-nearest neighbors*” – KNN), que é um classificador que usa proximidade para prever a classificação de um ponto de dados; de reforço adaptativo (“*adaptive boosting*” – AdaBoost), que funciona de forma iterativa, ajustando o peso de cada exemplo do conjunto de treinamento a cada rodada; de floresta randômica (“*random forest*” – RF), que usa várias árvores de decisão para

fazer previsões, sendo um método de aprendizado supervisionado que combina a saída de múltiplas árvores para chegar a um único resultado; de PCA e análise discriminante linear (*“linear discriminant analysis”* – LDA), para reduzir a dimensionalidade dos dados; e de máquinas de vetores de suporte (*“support vector machine”* – SVM), algoritmo usado para regressão e classificação. O algoritmo SVM forneceu acurácia de 88,61%. O sistema Raman portátil demonstrou medições robustas com um deslocamento de plano focal aceitável de até 3 mm, o que permitiu o mapeamento Raman de grandes áreas em tecidos ressecados, com tempo de medição inferior a 5 minutos.

Tais instrumentos podem ser utilizados em aplicações de campo para diagnóstico em triagem e rastreamento na área médica laboratorial, porém podem apresentar débil qualidade espectral quando comparados aos equipamentos de bancada, e seus resultados ainda são desafiadores.

2.4. ESPECTRÔMETROS RAMAN

2.4.1. Tipos de espectrômetros Raman

Os espectrômetros Raman são ferramentas poderosas para análise de diversos materiais, e cada tipo (de bancada, micro-Raman, portátil e *“handset”*) tem suas vantagens e desvantagens dependendo do uso, especialmente em contextos científicos.

Equipamentos de bancada, sendo maiores e em geral mais sofisticados, tendem a oferecer melhor resolução espectral e maior sensibilidade, o que é ideal para medições precisas, sendo geralmente mais estáveis, com menos interferências externas, resultando em dados mais consistentes e reprodutíveis e com melhor controle sobre as condições de medição do laser, como a temperatura e o comprimento de onda, e outros parâmetros. Além do mais possuem a flexibilidade de se adaptar a diversos tipos de amostras (sólidas, líquidas e gasosas) e técnicas avançadas de medição, como possibilidade de excitação com diferentes tipos de lasers e análise em várias faixas de números de onda (região de impressão digital – 200 a 2000 cm^{-1} , e região de alta frequência ou alto número de onda – entre 2500 e 4000 cm^{-1}).

Como eles equipamentos são em geral pesados e volumosos, a mobilidade e uso em campo são limitados e apresentam a desvantagem de serem modelos mais caros devido à sua complexidade e capacidade requerendo um local específico para instalação e operação, o que pode ser um limitador se for necessário que o equipamento seja transportado.

Os espectrômetros Raman portáteis oferecem a vantagens da portabilidade, já que sendo compactos podem ser utilizados em campo, permitindo análises “*in situ*”, evitando a manipulação excessiva da amostra, reduzindo o risco de contaminação e preservando sua integridade, sem a necessidade de serem transferidas para um laboratório. No entanto, dentre as desvantagens estão limitações em amostras com forte fluorescência e a dificuldade de otimização de alguns parâmetros de trabalho, como fontes de luz menos potentes e estáveis e detectores menos sensíveis, oferecendo menores precisão, resolução espectral e sensibilidade do que os equipamentos de bancada, mas ainda assim muito úteis para diversas aplicações. Em contrapartida, os equipamentos do tipo de mão “*handheld*”, são leves e compactos, ideais para análises em campo, em locais de difícil acesso ou para coleta de amostras em diferentes locais físicos, possuindo software simplificado e permitindo que até usuários com pouca experiência possam manipulá-los, possibilitando medições rápidas em campo, o que é muito útil em situações que exigem resultados imediatos. Comparados aos modelos de bancada e portáteis, os “*handheld*” tendem a ter uma resolução espectral inferior e sensibilidade reduzida, o que pode ser uma limitação para alguns tipos de análise, especialmente em materiais complexos e que requeiram maior exatidão, tendo menos possibilidade de ajustar variáveis como a intensidade do laser ou o controle de temperatura, com autonomia limitada em caso de modelos que funcionam com bateria, exigindo recarga frequente em medições de longa duração.

Como mostrado na Tabela 5, cada tipo de espectrômetro Raman é mais adequado a um tipo de aplicação específica. O espectrômetro de bancada é perfeito para análises complexas em laboratório, o portátil é necessário quando se busca facilidade de transporte e resolução média para análise de amostras em campo, e o “*handheld*” é ideal para medições rápidas e práticas de amostras em campo, que não requeiram alta sensibilidade e apresentem alta concentração.

Tabela 5 – Características gerais mostrando vantagens e desvantagens dos diversos tipos de espectrômetros Raman.

Características	Bancada	Portátil	De mão (“<i>Handheld</i>”)
Portabilidade	Baixa	Média	Alta
Resolução/Sensibilidade	Alta	Média	Baixa
Custo	Alto	Médio	Médio
Facilidade de uso	Pouca (requer mais treinamento pois vários parâmetros são ajustáveis)	Média (requer algum treinamento pois alguns parâmetros são ajustáveis)	Simple (requer treinamento mínimo pois poucos ajustes são necessários)
Aplicações ideais	Análise detalhada de amostras complexas ou com baixa concentração	Análise de amostras complexas mas com concentração média	Uso em campo e medições simples em compostos com concentração alta

2.4.2. Tipos de porta amostras

Na espectroscopia Raman, o tipo de porta-amostras (ou suporte para amostras) é um elemento decisivo para garantir que a amostra seja posicionada corretamente e que as condições de medição sejam repetitivas e representativas. Existem diversos tipos de porta-amostras, cada um adequado para diferentes tipos de amostras e configurações experimentais.

Os diferentes tipos de porta-amostras na espectroscopia Raman são essenciais para garantir a qualidade e a precisão das medições, além de possibilitar a análise de diferentes tipos de amostras (sólida, líquida, gasosa ou em pó) e sob condições controladas (temperatura, pressão, umidade, etc.). A escolha do porta amostras depende das características da amostra, das condições experimentais desejadas e da complexidade do equipamento disponível. Os principais tipos são:

Porta-amostras plano ou de lâmina, que é uma placa simples, geralmente de vidro ou outro material transparente, onde a amostra sólida, líquida ou em pó é colocada sobre. As amostras podem ser dispostas diretamente sobre a superfície, e em alguns casos, pode-se usar uma camada fina de fita adesiva para fixar a amostra

no local desejado, mas não é muito comum pois pode haver interferência do adesivo na coleta espectral.

Este tipo de porta-amostras é fácil de usar, simples e versátil, permite a análise direta de amostras em estado sólido ou líquido, podendo ser difícil de usar para amostras de tamanhos ou formas irregulares, ou amostras que exigem controle rigoroso de temperatura ou do ambiente.

Porta-amostras tipo microplaca (ou de orifício), que é uma estrutura com pequenos orifícios ou depressões de tamanhos variados onde a amostra pode ser depositada. Podem ser feitos de vidro, quartzo ou outro material transparente como plástico ou policarbonato. Dependendo do tipo de material a ser analisado, o porta amostras deve ser metálico, mas requer o cuidado especial da eventual reflexão da energia espalhada e que pode interferir nos resultados.

Os porta-amostras de microplaca são usados principalmente em amostras líquidas ou para pequenas quantidades de amostras, como em microplaquetas de 96 orifícios. Seu uso é comum em estudos biomédicos e químicos, onde a amostra é limitada em volume, permitindo análises rápidas de múltiplas amostras quando é necessária alta produtividade ou em experimentos que exigem análise de várias amostras de uma vez. Amostras volumosas ou com alta viscosidade são difíceis de analisar neste tipo de porta amostras.

Porta-amostras com controle de temperatura são suportes projetados para manter a amostra a uma temperatura constante, seja por aquecimento ou resfriamento. Eles geralmente incluem um sistema de controle térmico, como uma célula de resfriamento ou um termômetro embutido.

São usados quando é necessário controlar a temperatura da amostra durante a medição, como em estudos de transições de fase (ex. fusão ou solidificação) ou para evitar danos térmicos em materiais sensíveis ao calor, permitindo uma análise precisa de como, por exemplo, as propriedades Raman de uma amostra mudam com a temperatura. Porém são dispositivos caros e complexos, além de exigir uma configuração adicional de controle de temperatura.

Porta-amostras do tipo confocal são projetados para serem usados com um espectrômetro Raman confocal, onde a amostra é posicionada em um ponto focal preciso, com a capacidade de variação de diferentes profundidades da amostra ou superfícies de um material, como em amostras biológicas, filmes finos ou superfícies com várias camadas. Permitem uma análise de alta resolução e alta precisão, com a

capacidade de examinar a amostra em 3 dimensões, mas normalmente requer equipamentos especializados, como um microscópio confocal, o que pode aumentar o custo e a complexidade.

Porta-amostras com manipulação de pressão são projetados para permitir a aplicação de pressões altas ou baixas sobre a amostra, frequentemente utilizado para simular condições de alta pressão, sendo comum em estudos de materiais e geociências, onde as amostras precisam ser analisadas sob pressões elevadas ou em condições específicas, como as que ocorrem em grandes profundidades ou em experimentos de alta pressão. Permitem a análise de materiais sob condições não convencionais, oferecendo uma visão única das suas propriedades em diferentes estados de pressão, porém, requer equipamentos especializados que podem ser muito caros.

Porta-amostras para materiais em pó são projetados para que amostras em forma de pó sejam acondicionadas de maneira uniforme e estável. Pode ser uma superfície plana ou uma célula específica que mantém o pó no lugar, garantindo que a luz do laser incida de maneira consistente em amostras de materiais cerâmicos, catalisadores, pigmentos ou medicamentos em pó, por exemplo. Oferecem uma maneira fácil de analisar amostras em pó sem que o material se mova ou se disperse durante a medição, podendo, no entanto, ser difícil manter a homogeneidade da distribuição do pó sobre o suporte, o que pode afetar a consistência dos resultados.

Os porta-amostras para líquidos são suportes especializados em manter líquidos estáveis durante a análise. Essas células líquidas podem ser feitas de vidro, quartzo ou outros materiais transparentes, com paredes finas para permitir a passagem da luz, ou em materiais opacos, como o alumínio ou aço inox, quando indicado. Usado para amostras líquidas que precisam ser analisadas em uma célula fechada, como soluções aquosas ou solventes orgânicos. Permitem a análise direta de líquidos, com a vantagem de ter um volume de amostra controlado, mas a estrutura da célula pode afetar a intensidade do sinal Raman, por exemplo, ou exigir cuidados especiais na preparação da amostra, seja na distância focal correta ou na eventual refletância da energia espalhada quando se tratar de porta amostras metálicos.

Porta-amostras para análise de superfícies permite que a amostra seja posicionada de forma precisa, geralmente de modo a manter uma área da superfície

da amostra acessível ao laser para análise, em caso específico de filmes finos ou materiais texturizados, onde o porta amostras pode ter ajustes micrométricos para posicionamento preciso. Permitem uma análise precisa de superfícies e facilita a obtenção de informações localizadas, mas pode ser necessário um controle detalhado para evitar a variação na intensidade do sinal ao longo da superfície.

2.4.3. Pré-processamento dos espectros

Como qualquer outra técnica espectroscópica, os espectros Raman das amostras biológicas como o soros sanguíneos necessitam de pré-tratamento prévio (etapa de pré-processamento) por métodos adequados antes de serem submetidos à qualquer análise necessária a fim de obter uma informação precisa sobre o significado e alcances dos dados coletados.

A utilização de detector multicanal como a câmera CCD (dispositivo de carga acoplada – “*charge-coupled device*”) para realizar a medição do sinal difratado pela grade de difração do espectrógrafo, leva a necessidade de considerar-se a presença de ruídos inerentes a sistemas eletrônicos na captação do sinal luminoso, podendo ser classificados em: ruído térmico, ruído eletrônico de leitura, ruído gerado pelo sinal óptico da amostra (ruído de fóton), em geral proveniente da emissão fluorescente, e ruído gerado pelos raios cósmicos. Estas fontes introduzem ruído ao sinal Raman desejado e podem dificultar a interpretação dos espectros.

O pré-processamento dos espectros Raman envolve as etapas de remoção manual dos picos de raios cósmicos, correção da linha de base (remoção da fluorescência de fundo e da luz difusa “*stray light*”) mediante ajuste e subtração de uma função polinomial de baixa ordem (em geral de 3ª a 7ª ordem), normalização pela área sob a curva, e finalmente suavização do ruído de alta frequência por um filtro tipo Savitzky-Golay. A Figura 14 demonstra essas diferentes etapas.

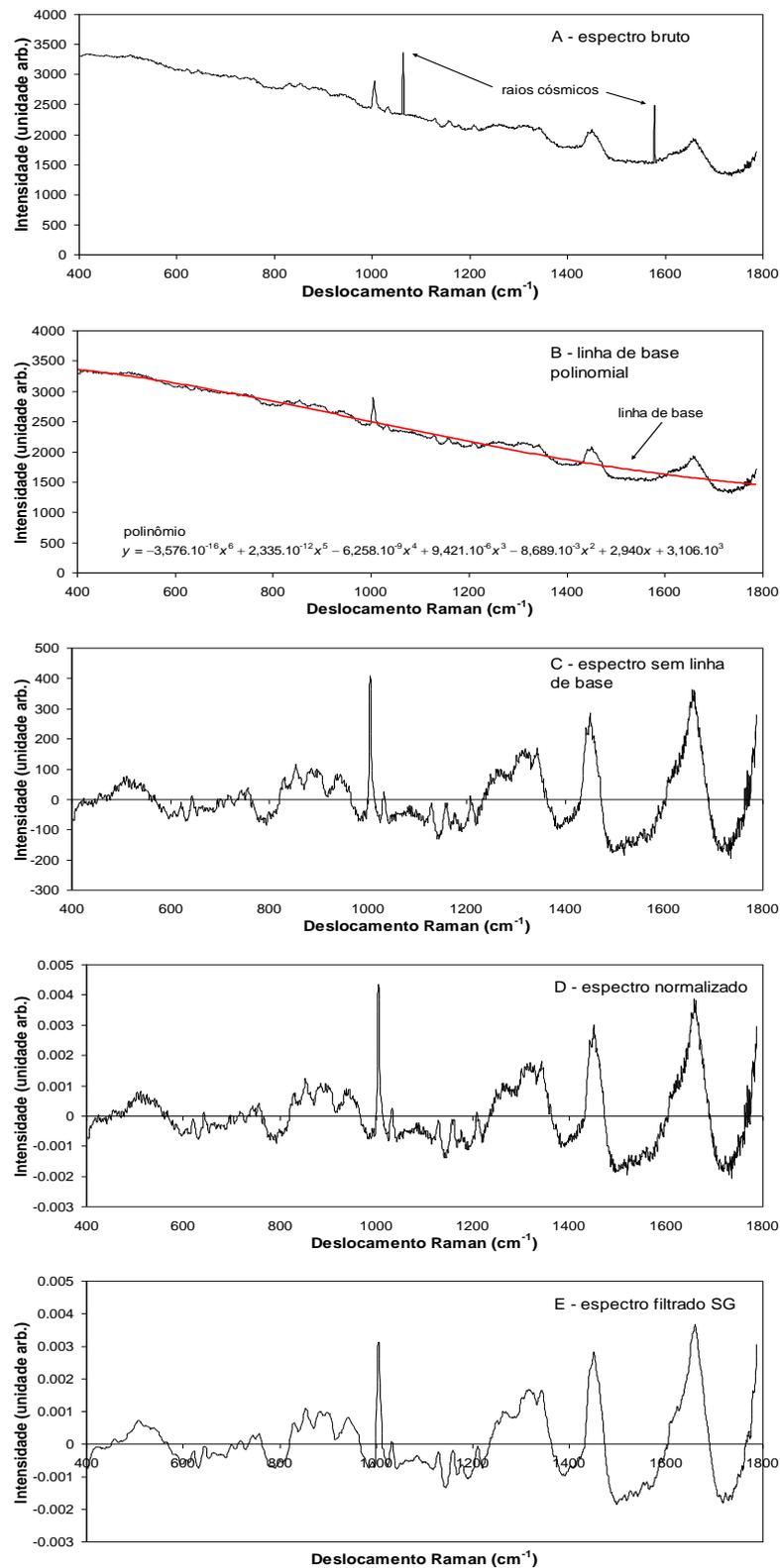


Figura 14 – Etapas de pré-processamento aplicadas a espectros Raman: (A) Exemplo de espectro bruto mostrando os picos de raios cósmicos. (B) O mesmo espectro com a retirada dos raios cósmicos e a marcação da linha de base. (C) Remoção da linha de base (fluorescência e luz difusa). (D) O mesmo espectro normalizado. (E) Aplicação do filtro tipo Savitzky-Golay.

2.4.3.1. Raios cósmicos

Ao incidirem na câmera CCD, os raios cósmicos, que são partículas atômicas de alta energia, especificamente núcleos de hidrogênio (prótons) e de hélio de origem extraterrestre, que viajando próximos à velocidade da luz, chegam à superfície da Terra e interagem com o material da CCD e geram sinais que se superpõem aos sinais gerados pelos fótons provenientes da amostra. Incidem aleatoriamente em pontos diferentes e interferem nos gráficos do espectro Raman, aparecendo como picos bem estreitos e de alta intensidade. Os raios cósmicos que chegam ao equipamento na hora da coleta, e que prejudicam a leitura posterior, devem ser eliminados. Para eliminar a interferência do ruído dos raios cósmicos, são utilizadas técnicas de processamento de dados, a maioria delas baseada na taxa de variação (subida) de uma banda, já que o raio cósmico caracteriza-se por apresentar alta intensidade em uma pequena largura de banda espectral, sendo de fácil detecção.

Remover os raios cósmicos em espectros Raman é um processo trabalhoso que implica na revisão de cada espectro, identificando e removendo manualmente os pontos de intensidade anormal, que são característicos dos raios cósmicos, estreitos e de alta intensidade, muito diferentes dos picos Raman no espectro. Em muitos casos, existem algoritmos de software que podem remover automaticamente os raios cósmicos, o que pode ser mais eficiente.

2.4.3.2. Linha de base

Na aquisição de um espectro Raman, que também pode ocorrer em outras formas de sinais espectrais adquiridos em dispositivos multicanal, há uma linha espectral basal que não corresponde ao sinal da amostra analisada, mas é consequência de sinal adquirido como uma espécie de fundo espectral ou ruído de escuro (“*dark noise*”) da própria aquisição. Se uma aquisição for tomada sem a amostra, aparecerá graficamente uma linha espectral correspondente a esse fundo. Esta linha de base (ou “branco” de aquisição) deve ser descontada do espectro amostral para medir a amostra pura. Isso ajuda a padronizar os resultados.

Normalmente, os equipamentos possuem um comando dentro do software que realiza esta ação automaticamente, realizando a aquisição de um sinal coma fonte de excitação desligada; em outros casos, esta leitura deve ser feita manualmente. Então,

em primeiro lugar, é importante e necessário eliminar a linha de base presente no espectro que, como mencionado, corresponde ao “branco” de reagentes da espectrofotometria colorimétrica.

2.4.3.3. Fluorescência de fundo e luz difusa

O espalhamento Raman representa a detecção de fótons espalhados que trazem as mudanças na energia vibracional das moléculas pela interação dos fótons com uma amostra, ao contrário da fluorescência de fundo que é a emissão de luz por decaimento dos elétrons de níveis eletrônicos excitados para níveis fundamentais após a excitação das moléculas dessa amostra, podendo ter uma intensidade maior do que o sinal Raman e tornando difícil ou impossível detectar as bandas de espalhamento Raman características do material analisado. A redução desta fluorescência de fundo é crucial para a obtenção de espectros Raman de alta qualidade. Porém, muitas vezes eliminar a fonte de geração da fluorescência é difícil, e o que se faz geralmente é eliminar a linha de base dessa fluorescência, pelo uso de algoritmos de filtros, muitas vezes integrados no software de espectroscopia, que submetem os dados de espectros Raman a um tratamento que visa modelar e remover a fluorescência, permitindo a visualização de sinais Raman mais claros. Espectrômetros Raman mais modernos já realizam este trabalho automaticamente.

Já a luz dispersa ou difusa (“*stray light*”) refere-se à luz indesejada que entra em um sistema óptico e interfere com as suas funções. Pode ser causada por reflexos, dispersão ou outros efeitos ópticos não intencionais. A luz difusa pode se tornar um problema sério em espectroscopia Raman e sua eliminação é essencial para garantir a qualidade e precisão dos resultados.

A remoção da fluorescência de fundo (“*background*”) e da luz difusa (“*stray light*”), junto com a correção de linha de base dos espectros, pode ser realizada através do ajuste e subtração de uma função polinomial de baixa ordem (em geral de 3ª a 7ª ordem) em toda a faixa espectral de interesse.

2.4.3.4. Normalização

Devido a variação das intensidades que acontecem nas análises espectroscópicas, ocasionada pela variabilidade na intensidade da radiação de

excitação durante as tomadas dos espectros, além de outros efeitos físicos que eventualmente podem acontecer, um conjunto de espectros para uma mesma amostra pode apresentar diferenças significativas de intensidades entre si. Este pré-processamento de normalização tem por objetivo remover ou minimizar variações sistemáticas das amostras (Beebe *et al.*, 1998).

A normalização pode ser obtida dividindo-se cada variável por uma constante obtida do próprio sinal, assim as variáveis ficam em uma mesma escala. Esta constante pode ser a soma dos valores absolutos de todas as variáveis para uma determinada amostra, sendo chamada de normalização pela área total.

Outra forma de fazê-lo é através de uma transformação linear, na qual todos os valores referentes à resposta, fiquem no intervalo de mínimo 0 e máximo 1, chamada de normalização pelo mínimo e máximo, sendo a forma mais simples de normalizar (Gemperline, 2006). A escolha de qual constante vai ser utilizada para normalizar depende de qual variação se quer remover (Beebe *et al.*, 1998).

2.4.3.5. Suavização (filtro tipo Savitzky-Golay)

A suavização pelo algoritmo proposto por Savitzky e Golay (SG) trabalha ajustando-se um polinômio em uma região simétrica ao redor do ponto de interesse (tamanho da janela), para em seguida substituir o valor deste ponto pelo valor previsto pela função ajustada, a fim de corrigir os efeitos da linha de base, e do ruído espectral (fluorescência de fundo – “*background*” e “*stray light*”).

O tamanho da janela deste polinômio deve ser escolhido de forma a atenuar o ruído, sem perda de informações importantes. Os pontos do sinal ao qual se aplica o filtro são obtidos através do ajuste dos pontos do intervalo desejado com um polinômio de grau variável (não utiliza-se média simples dos pontos vizinhos como ocorre com outro tipo de filtros). Esta característica possibilita que o filtro Savitzky-Golay seja aplicado a sinais com picos estreitos, apresentando resultados superiores aos obtidos com outros tipos de filtro. Com menos ruído, há a obtenção de respostas analíticas com menor quantidade de influências não desejadas (ruído), podendo gerar modelos com melhor ajuste (Rinnan *et al.*, 2009).

2.5. PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS – REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

No mundo real, muitas coisas estão relacionadas. Portanto, é de se esperar que exista em um sistema físico o relacionamento de uma variável dependente com mais de uma variável explanatória. E, de fato, regressões com mais de uma variável explanatória são muito mais comuns. Nesse caso, quando a regressão estimada é composta por um conjunto de duas ou mais variáveis explanatórias, se tem em mãos um modelo de regressão linear múltipla.

A variável dependente ou de resposta (**Y**) representa uma grandeza cujo valor depende de como a variável independente, preditora ou explanatória (**X**), é manipulada.

Uma regressão linear deve ser usada quando se desejam realizar projeções e estudar a relação entre duas variáveis. No entanto, há algumas limitações. A regressão linear, por natureza, assume uma relação linear entre as variáveis independentes e dependente. Se os dados não apresentarem uma relação linear, ou se violarem outros pressupostos do modelo (como homocedasticidade, normalidade dos resíduos), a regressão linear pode não ser adequada ou levar a inferências incorretas.

Variáveis podem ser classificadas em quantitativas contínuas ou discretas. Variáveis contínuas são valores fracionais, normalmente medidas por equipamentos (balança, relógio, régua, etc.). As discretas constituem-se em números inteiros (número de filhos, bactérias por unidade de volume, etc.). Variáveis também podem ser classificadas em qualitativas, que são categóricas, podendo ser nominais (sexo, cor, altura, etc.) ou ordinais (escolaridade, meses do ano, etc.). Para que seja possível estimar uma regressão com menos chance de realizar inferências equivocadas, a variável dependente deve ser contínua. Para variáveis categóricas nominais e ordinais, a regressão logística e o modelo Probit se ajustam de forma melhor.

A interpretação da regressão linear é feita normalmente com softwares específicos, como Stata, SPSS, SAS, ou linguagens de programação como R e Python. É possível também realizar a regressão pelo software Excel.

Uma regressão linear apresenta a seguinte forma funcional:

Simple: $Y = a + bX + u$

Múltipla: $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + u$

Quando se estima uma regressão linear, se está interessado em estimar o valor dos parâmetros a e b . Adicionalmente, a toda regressão, existe um termo de erro a ela relacionado, representado por u .

Associados à regressão, se têm algumas medidas estatísticas que merecem destaque. Todo modelo possui uma capacidade de explicação do fenômeno ao qual se propõe a explicar, o nome desta medida é coeficiente de determinação, também conhecido como R^2 , sendo que esse coeficiente varia entre 0 e 1 e é expresso em valores percentuais, onde 0 corresponde a 0% e 1 a 100%. Ele representa a proporção da variabilidade na variável resposta explicada pela variável preditora ou variável explanatória.

Assim, quanto maior for o R^2 , mais explicativo é o modelo linear, ou seja, melhor ele se ajusta à amostra. Por exemplo, um $R^2 = 0,881$ significa que o modelo linear explica 88,1% da variância da variável dependente a partir dos preditores (variáveis independentes) incluídas naquele modelo linear.

Outra medida importante é o valor de p associado aos parâmetros. Essa medida diz se as variáveis independentes que compõem o modelo realmente apresentam uma relação estatística como a variável dependente. Geralmente, considera-se que uma variável não é estatisticamente significativa quando o valor de p associado a seu parâmetro estimado é maior que 0,05, ou 5%.

O termo de erro u representa todas as variáveis omitidas no modelo, mas que, de certa forma e coletivamente, afetam Y .

Uma regressão representa uma tendência, que nem sempre se confirma. Na prática, quando esta tendência não se confirma, os desvios em torno da média são captados pelo termo de erro aleatório u .

2.5.1. Métodos quimiométricos

Na química, muitos resultados analíticos são apresentados como um conjunto de dados medidos, que podem trazer a informação da amostra associada a ruídos gerados pela natureza da instrumentação. Em alguns casos, a magnitude do ruído é tão grande quanto a informação, o que dificulta encontrar os resultados interessantes em um conjunto de dados multidimensionais. As soluções de tais problemas estão dentro do escopo da quimiometria, pois são capazes de excluir o máximo possível de ruído dos conjuntos de dados e de adquirir o máximo possível de informações dos dados

multidimensionais, tratando de extrair informações valiosas de um conjunto de dados multidimensionais por meio de métodos matemáticos e estatísticos.

Frequentemente, a análise exploratória de dados é empregada para resumir os padrões de uma matriz de dados, a fim de avaliar suas características, bem como o relacionamento entre amostras e variáveis. Dependendo do tipo de informação a ser explorada, os principais tipos de análise de dados são: descritivo, que descreve o histórico do que já aconteceu; diagnóstico, que busca identificar as causas dos eventos; preditivo, que busca prever resultados futuros; e prescritivo, que sugere ações para obter melhores resultados, sendo que cada um deles colabora para obter informações diferentes, auxiliando no resultado final.

A PCA e a análise fatorial são dois métodos amplamente utilizados na análise exploratória, cujos objetivos são: a extração de informações importantes relacionadas, reduzindo o número de variáveis latentes por meio de combinações lineares das variáveis originais seguindo um determinado critério; a identificação de possíveis agrupamentos (“*clusters*”) e exploração da diferença na variabilidade dos objetos, a detecção de pontos discrepantes (“*outliers*”) e a identificação de tendências e agrupamentos nas amostras e variáveis.

Normalmente, a análise exploratória dos dados é o primeiro passo em um processo de classificação, que geralmente é realizado por métodos de reconhecimento de padrões. Assim, dependendo da classe que pertencem as amostras, podem ser realizados dois tipos de métodos de classificação baseados em reconhecimento de padrões: métodos não supervisionados e supervisionados.

Os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados não assumem qualquer conhecimento prévio dos dados, o que poderia fornecer uma visão imparcial dessa matriz, e são usados principalmente para descobrir o potencial de padronização em um conjunto de dados. Desses, os mais comumente utilizados são métodos que incluem PCA, PCA-robusto, análise hierárquica de grupos (HCA), etc. Entre eles, a PCA e HCA são as abordagens não supervisionadas mais aplicadas.

2.5.2. Análise de componente principal (PCA)

A análise de componente principal é a técnica de análise exploratória mais utilizada. Esta técnica permite redução da dimensionalidade dos dados (geralmente em duas ou três dimensões) representando-os em um novo sistema de eixos,

chamados de componentes principais (PCs), os quais são obtidos a partir da direção de máxima variância dos dados e permitem identificar similaridades entre amostras, além de detectar amostras anômalas (“*outliers*”) (Ferreira, 2022). Na PCA, a matriz de dados original (\mathbf{X}) é decomposta no produto de duas matrizes: os Escores (\mathbf{T}), que são as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos; e os Pesos (\mathbf{P}), que são os cossenos dos ângulos formados entre as variáveis originais e as componentes principais.

Visto que a direção dos PCs é baseada na máxima variância, o primeiro, PC_1 , terá a máxima variância entre os dados, e o segundo, PC_2 , terá a segunda máxima variância, e assim sucessivamente.

A PCA foi originalmente desenvolvida por Pearson em 1901 e é uma ferramenta utilizada para converter um espaço de dados multidimensional em um subespaço de menor dimensão. Essa técnica corresponde a um procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal, isto é, ortogonalização de vetores, para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de variáveis linearmente não correlacionadas que são denominadas de componentes principais (PCs). Cada PC é uma combinação linear das variáveis originais e cada PC explica sucessivamente a máxima quantidade de variância, a qual não foi contabilizada pelas PCs anteriores.

Assim, a PCA converte o conjunto de dados original em duas matrizes conhecidas como Escores (“*scores*”) – \mathbf{T} e Pesos (“*loadings*”) – \mathbf{P} . Os Escores são coordenadas recém-definidas para as amostras e o gráfico de escores fornece informação sobre a dessemelhança dos objetos, uma vez que os pontos que estão próximos um dos outros têm perfis semelhantes. Por outro lado, objetos que se encontram distantes são caracterizados por propriedades diversas. Já os Pesos dos PCs descrevem como as variáveis originais são integradas linearmente nesses novos eixos e mostram qual a sua importância ou influência no conjunto de dados.

O ponto importante do método PCA é de que se pode capturar a maior parte das informações contidas no conjunto de dados \mathbf{X} através dos primeiros componentes principais, e então modelar uma regressão com eles, supondo que a direção de maior variação de X é a direção correlacionada com Y . É importante notar que a PCA não é capaz de escolher quais variáveis melhor explicam os dados, já que a análise é feita sobre todo o conjunto \mathbf{X} simultaneamente. Ademais, os dados trabalhados devem ser normalizados, pois, diferentemente da regressão

linear usual, a regressão feita com PCA dá mais ênfase para variáveis de maior escala, pois sua variação é maior do que a das outras.

2.5.3. Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS

A regressão por mínimos quadrados parciais (“*partial least squares*” – PLS) é um dos métodos de regressão mais importantes, por conta de uma característica fundamental frente a outros métodos: captura a covariância entre as variáveis independentes (\mathbf{X}) e as dependentes (\mathbf{Y}). É útil para prever propriedades por meio dos modelos criados, para prever similaridades entre conjuntos de amostras diferentes, a partir do modelo obtido pelos dados de calibração (Brereton, 2003).

A PLS é um método de regressão multivariada que encontra uma relação linear entre a matriz de variáveis dependentes (\mathbf{Y}) e a matriz de variáveis independentes (\mathbf{X}). Pode-se afirmar que o objetivo da regressão PLS é prever \mathbf{Y} a partir de \mathbf{X} e descrever sua estrutura comum buscando um conjunto de componentes, variáveis latentes (“*latent variables*” – LVs), que executam uma decomposição simultânea de \mathbf{X} e \mathbf{Y} com restrição de que esses componentes expliquem o máximo possível da covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} (Lin *et al.*, 2017). Esse método, além de generalizar a PCA, é seguido por uma regressão, onde os vetores das variáveis latentes obtidos a partir de \mathbf{X} são utilizados para prever \mathbf{Y} . Desse modo, a regressão PLS decompõe ambos \mathbf{X} e \mathbf{Y} como um produto de um conjunto comum de fatores ortogonais e um conjunto de pesos específicos.

A matriz preditora \mathbf{X} é decomposta em componentes de forma semelhante a PCA, gerando a matriz de Escores (\mathbf{T}) e a matriz de Pesos (\mathbf{P}), como explicado pela fórmula: $\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$, bem como para \mathbf{Y} , com Escores (\mathbf{U}) e Pesos (\mathbf{Q}) como em $\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}^T + \mathbf{F}$. As matrizes \mathbf{E} e \mathbf{F} são denominadas resíduos (Gemperline, 2006).

Um cálculo iterativo faz com que \mathbf{T} e \mathbf{U} se ajustem de forma a maximizar a correlação entre a matriz dependente e a matriz independente. Como não há necessariamente ortogonalidade entre \mathbf{T} e \mathbf{U} , a correlação tenta aproximar do zero as matrizes residuais, como em $\mathbf{U} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{W}$, na qual \mathbf{W} é uma matriz peso.

É importante ressaltar que, quanto maior for o número de variáveis latentes para o modelo, maior é o desvio da linearidade entre os dados usados para a calibração (Ferreira, 2022).

Como descrito, PLS é um acrônimo que originalmente representa uma regressão de mínimos quadrados parciais, mas com o passar dos anos, alguns autores desenvolveram essa sigla como projeção para estruturas latentes. De qualquer forma, a regressão por PLS combina características e generaliza a PCA e a regressão linear múltipla.

Desde a sua introdução, a regressão por PLS tornou-se o método de escolha para a calibração multivariada de dados espectrais devido à alta qualidade e robustez do modelo de calibração e à sua relativa facilidade de implementação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Esta pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos e normas regulamentadoras para pesquisas envolvendo humanos, de acordo com os requisitos da Resolução No. 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde – CNS (Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde, 2012), tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi (UAM), São Paulo, SP, Brasil sob No. CAAE: 68948922.6.0000.5492.

3.2. AMOSTRAS DE SORO HUMANO

Um total de 193 amostras de soro de rotinas ambulatoriais foram coletadas no Laboratório Vivalle, em São José dos Campos, SP, Brasil. Alíquotas de 1,5 mL de soro foram obtidas a partir de amostras de 4,0 mL de sangue total colhidas em tubos com gel seguindo a rotina laboratorial (para exames clínicos). Os soros foram separados do sangue por centrifugação a 4300 rpm.

As amostras de soro foram processadas conforme a rotina laboratorial e as concentrações dos analitos TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI foram determinadas pelo método padrão ouro utilizando um autoanalisador espectrofotométrico automático (modelo Cobas Integra 400 Plus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Após a análise laboratorial, uma alíquota de cada amostra foi armazenada em refrigeração ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) para análise por espectroscopia Raman.

Antes de serem analisadas por espectroscopia Raman, as amostras de soro, armazenadas em refrigeração ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), foram descongeladas passivamente. Conforme Lange *et al.* (2018), amostras de soro assim refrigeradas não apresentaram evidências de degradação quando armazenadas durante mais de 15 anos no biorrepositório da Universidade Regional de Blumenau, na cidade de Pomerode, Blumenau, SC. Em um trabalho realizado por Kuchmak, Taylor e Olanski (1982) com soro humano, não foram encontradas alterações das concentrações de colesterol e triglicérides em amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco anos. Fipps *et al.* (1988) avaliaram o efeito do congelamento e descongelamento de 20 ciclos

consecutivos sobre a determinação de anticorpos anti-HIV (“*human immunodeficiency vírus*” – HIV) em exames de sangue que detectam a presença de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana em amostras de plasma, e observaram que não houve perda da reatividade de anticorpos específicos em função do processo de descongelamento nas amostras analisadas. Em um trabalho realizado por Gislefoss *et al.* (2009), amostras de soros armazenadas durante 25 anos a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Janus Serum Bank (Institute of Population-Based Cancer Research, Cancer Registry of Norway, Oslo, Noruega) não mostraram diferenças significativas nas concentrações de imunoglobulinas em relação a exames anteriores em amostras não congeladas. Estes trabalhos sugerem que não há alteração da concentração dos analitos quando as amostras são conservadas em congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. ANALITOS TESTADOS

Os analitos testados foram os seguintes: colesterol total (COL), triglicérides (TRI), lipoproteínas de alta densidade (HDL), ureia (URE), creatinina (CRE) e glicose (GLI). Alíquotas variadas de 80 a 400 μL de soro foram analisados por espectroscopia Raman usando porta-amostras diversos, sendo posteriormente armazenadas em tubos Eppendorf a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias, para eventuais repetições.

Os espectros Raman coletados nestas amostras foram tratados por modelos espectrais baseados na regressão multivariada PLS em comparação com as concentrações determinadas pelo método de referência (espectrofotometria), a fim de obter a concentração estimada do analito de interesse para cada amostra. Foi também realizada a adição de solução de glicose a um conjunto de amostras de soro e avaliada no espectrômetro de bancada, a fim de verificar se o aumento do sinal espalhado pela glicose adicionada poderia melhorar a relação sinal/ruído (RSR) e conseqüente melhorar os parâmetros da regressão. Por fim, os espectros dos analitos que tiveram melhor desempenho foram classificados em Normais e Alterados utilizando a análise discriminante por PLS.

3.3.1. Controle de Qualidade

Na rotina laboratorial, de acordo com o PNCQ (Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ 2023, 2023), o laboratório participante do PRO-EX recebe amostras de soro com concentrações pré-definidas, para serem processadas junto com as amostras de trabalho com os valores de aceitabilidade de resultados baseados no desvio padrão (DP) para cada analito. Se o resultado obtido na espectrofotometria padrão ouro estiver dentro dos limites de ± 2 DP, o laboratório tem sua qualidade certificada. Alguns laboratórios, no entanto, determinam um valor de DP inferior ao recebido objetivando estreitar os limites de variabilidade, como foi o caso do laboratório que forneceu as amostras para esta pesquisa.

O parâmetro coeficiente de variação (CV%) relaciona em porcentagem os parâmetros DP e a média aritmética (M) dos valores para cada analito em um conjunto de dados ($CV\% = DP/M$). Quanto maior for seu valor, maior a variabilidade das informações em relação à média, o que indica um grupo de dados mais heterogêneo. Os valores de CV% para o espectrofotômetro utilizado neste trabalho (modelo Cobas Integra 400 Plus) são mostrados na Tabela 6, cujos valores ficaram abaixo do esperado, evidenciando a excelência dos resultados de quantificação, constituindo alta eficiência nos resultados de diagnóstico clínico.

Tabela 6 – Valores médios de CV% para o espectrofotômetro Cobas Integra 400 Plus, valores estes obtidos a partir dos resultados das quantificações dos controles analíticos da Controlab em relação aos grupos Referência e Alterado.

Analito	Indicador de CV%					
	Valor % Controle Referência			Valor % Controle Alterado		
	Esperado*	Aceitável**	Obtido	Esperado*	Aceitável**	Obtido
Triglicérides	8,0	8,8	1,8	7,9	8,7	1,8
Colesterol	6,5	7,2	2,0	6,5	7,2	2,1
HDL	16,6	18,3	4,6	16,7	18,4	5,0
Creatinina	17,2	18,9	4,8	9,8	10,8	3,5
Ureia	9,1	10,0	3,1	9,1	10,0	3,3
Glicose	6,5	7,2	2,0	6,5	7,2	1,8

* valor médio de CV% a partir de uma média de valores dos analitos obtidos em 8 meses

** valores aceitáveis determinados pelo PNCQ

3.4. ESPECTRÔMETROS UTILIZADOS

Foram utilizados três espectrômetros conforme descrição abaixo. As especificações técnicas e características dos três espectrômetros utilizados (#1, #2 e #3) para a coleta dos espectros estão descritas na Tabela 7.

- Espectrômetro #1 – instrumento portátil (modelo Cora 5200, Anton Paar Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), equipamento disponível no Laboratório de Espectroscopia Vibracional da UAM. Neste espectrômetro foram analisadas 42 amostras.
- Espectrômetro #2 – instrumento portátil (modelo Cora 5001-785, Anton Paar Brasil Ltda.), equipamento disponibilizado para ensaios pelo representante da fabricante. Neste espectrômetro foram analisadas 100 amostras.
- Espectrômetro #3 – instrumento de bancada (modelo Dimension-P1-HR, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA), com sonda Raman (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc.) para a aquisição dos espectros. Este equipamento está disponível no Laboratório de Espectroscopia Vibracional da UAM e neste espectrômetro foram analisadas 51 amostras.

Tabela 7 – Especificações técnicas e características dos três espectrômetros utilizados para a coleta dos espectros nas amostras de soro.

Parâmetros/ Especificações técnicas	Espectrômetro		
	#1 – Cora 5200	#2 – Cora 5001-785	#3 – Dimension-P1-HR
Excitação	785 nm	785 nm	830 nm
Faixa espectral*	100 a 2300 cm^{-1}	100 a 2300 cm^{-1}	150 a 2075 cm^{-1}
Resolução*	6 a 9 cm^{-1}	6 a 9 cm^{-1}	2 a 3 cm^{-1}
Potência do laser (máxima)	450 mW	450 mW	350 mW
Espectrógrafo	f/2 transmissão VPG**	f/2 transmissão VPG**	f/1.8 Czerny-Turner
CCD	Linha de 2048 pixels	Linha de 2048 pixels	Matriz de 1340x100 pixels
Sonda Raman	não	não	sim

* de acordo com os respectivos manuais

** VPG – volume phase grating

3.5. COLETA DOS ESPECTROS RAMAN

Os espectros Raman das amostras de soro foram obtidos no laboratório da UAM, em uma sala com ambiente controlado (temperatura de 24 °C e umidade de 60%), em conformidade com a biossegurança e padrões de controle de toxemias e infecções.

A Figura 15 mostra o fluxograma dos ensaios realizados em cada espectrômetro com a sequência cronológica do ensaio.

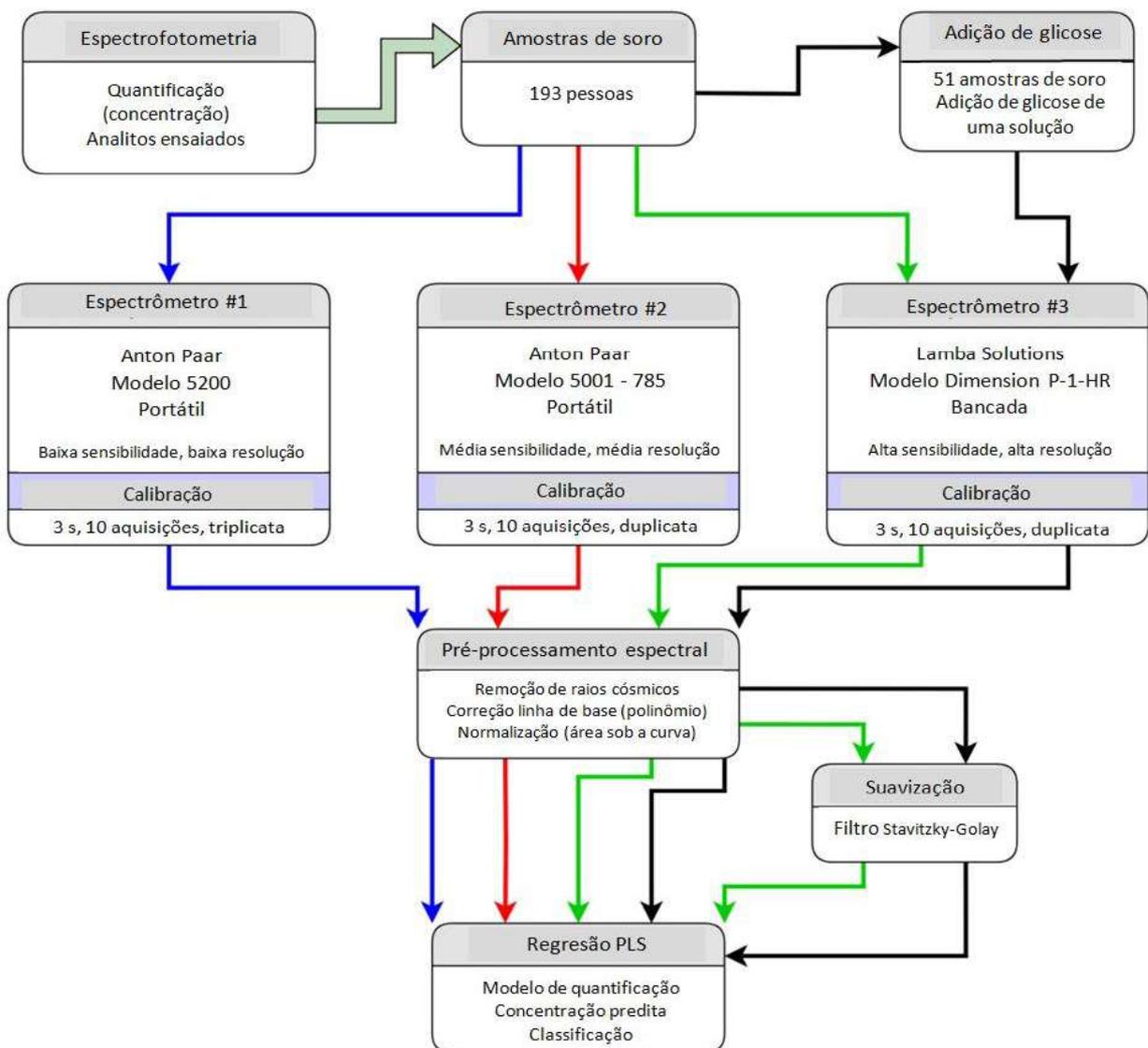


Figura 15 – Fluxograma com as etapas da pesquisa.

Os espectros foram adquiridos e armazenados usando um microcomputador PC “desktop” (Intel Core II com Windows XP) e software (versão 2.0, RamanSoft, Lambda Solutions Inc.), para o espectrômetro #3, de bancada, e nos softwares dos próprios equipamentos, para os espectrômetros #1 e #2, portáteis, sendo posteriormente transferidos para um microcomputador PC “desktop” (modelo HP Pavillion all-in-one, Intel Core I5 com Windows 10).

Alíquotas de aproximadamente 400 µL de cada amostra de soro foram pipetadas no suporte de alumínio com 8 orifícios de capacidade, e cada orifício foi posicionado horizontalmente ao centro e verticalmente à altura do foco do laser de excitação (com o uso da sonda Raman para o espectrômetro #3), e os espectros foram então coletados. Todas as aquisições foram feitas com 3 s de exposição e 10 acumulações, em triplicata para o espectrômetro #1, e em duplicata para os espectrômetros #2 e #3. A posição horizontal da amostra foi levemente modificada em cada replicata para que fosse alterada a posição horizontal do foco e conseqüentemente do volume amostrado. Após a coleta dos espectros, o volume remanescente de cada amostra foi armazenado em freezer a -20 °C para eventuais repetições.

O espectrômetro #3 foi previamente calibrado para a resposta em intensidade (resposta espectral) – eixo das ordenadas e deslocamento Raman – eixo das abscissas (Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2017). Os espectrômetros #1 e #2 tiveram a verificação da calibração com referência ao deslocamento Raman (eixo das abscissas) coletando-se o espectro do naftaleno e comparando-se seus picos com os descritos na literatura. Para a correção da intensidade de resposta espectral, foram utilizadas curvas fornecidas pelos fabricantes. A região espectral de 400 a 1800 cm^{-1} foi selecionada para a análise espectral, nos três espectrômetros.

A coleta dos espectros foi feita na máxima potência do laser. O tempo de coleta pode ser aumentado, porém, o ponto importante foi obter-se um sinal Raman com boa RSR.

3.5.1. Calibração da resposta espectral

Os espectrômetros Raman necessitam de correção da curva de resposta em intensidade já que possuem componentes ópticos que podem distorcer a intensidade do sinal coletado, gerando ondulações que podem comprometer a

identificação de picos espectrais de interesse. Para medição de alturas de picos espectrais relativas ou realização de medições de intensidade absoluta, é essencial compensar as perdas ópticas dentro do instrumento.

A resposta do instrumento é controlada pelo desempenho de todas as partes do espectrômetro. As lentes, os espelhos e o detector apresentam diferenças em suas superfícies devido a defeitos de fabricação ou pela poeira acumulada pelo uso. Fibras ópticas, espelhos e filtros passa-banda tendem a ter perdas baixas e são uniformes em toda a faixa espectral. O detector e a grade de difração podem ter variações mais significativas.

A Figura 16 mostra o espectro bruto observado em um determinado espectrômetro, ao lado da resposta espectral quando a correção é aplicada. O número de contagens recebidas por cada pixel é ajustado por uma correção de resposta do instrumento.

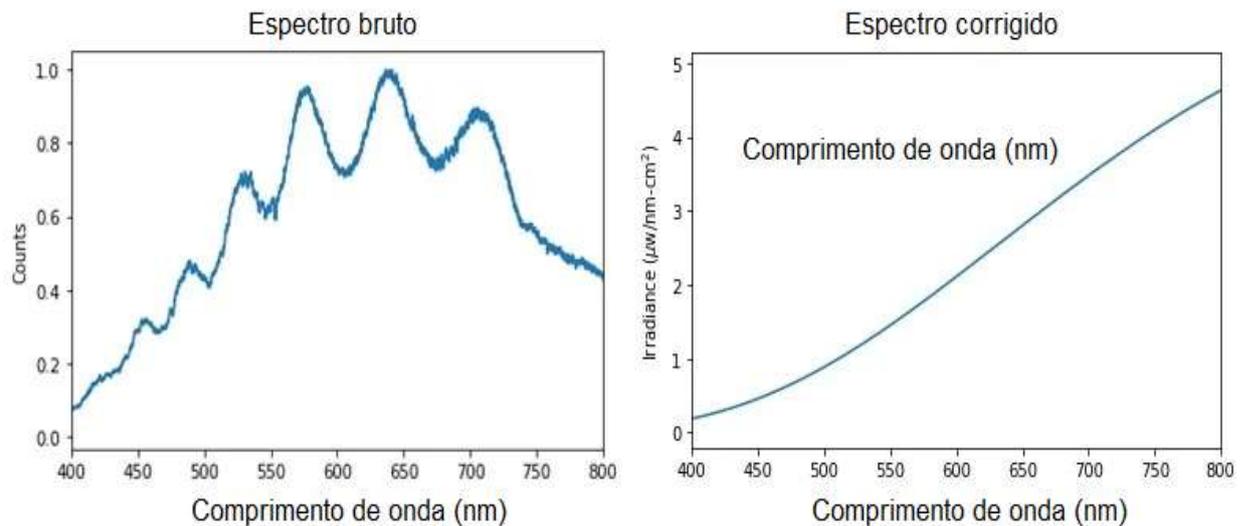


Figura 16 – Esquerda: espectro bruto adquirido de uma lâmpada de tungstênio. Direita: o mesmo espectro, corrigido para a resposta do espectrógrafo. Fonte: IS Instruments, 2017.

Detectores tipo CCD com cobertura de vidro, por exemplo, são capazes de produzir um efeito de interferência conhecido como etalonamento (“*etaloning*”), que é um efeito das múltiplas reflexões da luz incidente na CCD entre a superfície de vidro e a superfície do sensor, bem como dentro do próprio vidro, o que leva a interferências construtivas e destrutivas. O efeito visível é a oscilação de baixa frequência ou ondulação no sinal como a observada na Figura 16 à esquerda.

A maneira mais simples de compensar ou corrigir a resposta espectral total do sistema é obter o espectro de uma fonte de luz com um perfil de emissão conhecido, como a lâmpada de tungstênio, por exemplo, (Li *et al.*, 2014) que possui espectro de emissão próximo a de corpo negro e cuja resposta depende do posicionamento da lâmpada e de outras geometrias do instrumento, como o tamanho da abertura do espectrômetro. Em geral, os espectrômetros não são fornecidos com a curva de correção de resposta da intensidade. A Figura 17 mostra um diagrama esquemático do processo de obtenção do espectro.

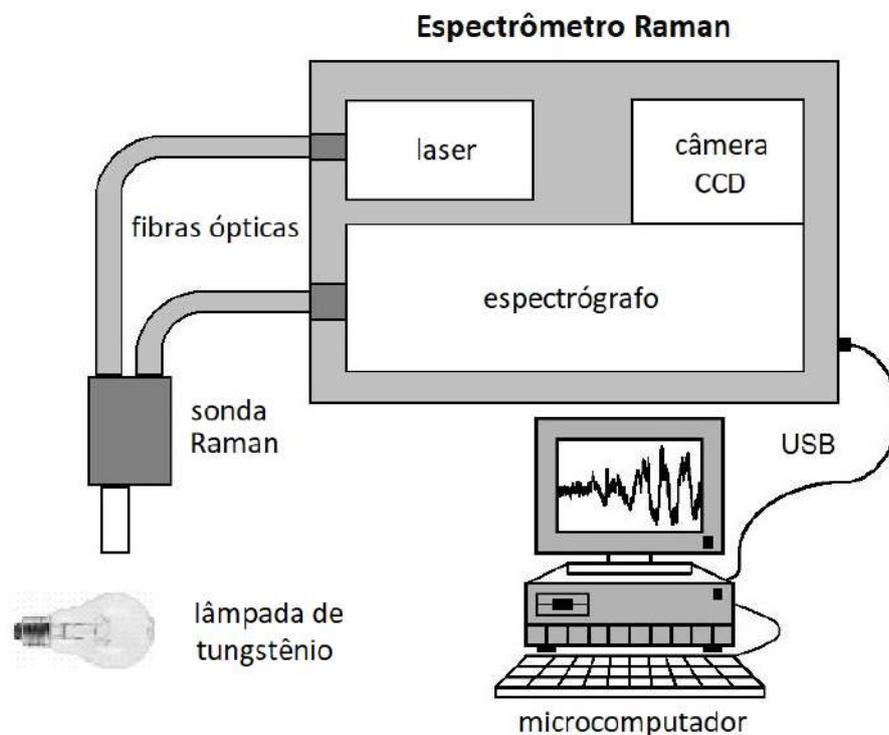


Figura 17 – Diagrama esquemático para coleta do espectro da lâmpada de filamento e obtenção da curva de correção de resposta da intensidade.

O espectro da lâmpada observado pelo espectrógrafo é dividido pelo espectro de emissão conhecido da mesma, em geral fornecido pelo fabricante, para fornecer a resposta relativa do instrumento. Esta função de resposta é então usada para corrigir cada novo espectro. O fator de escala pode ser aumentado em pixels de números mais altos, correspondendo a comprimentos de onda mais longos e onde em geral a câmera CCD é menos sensível.

3.5.2. Influência da posição do foco

Os espectrômetros Raman que usam uma geometria de retroespalhamento são adequados para a caracterização de sólidos, pós e líquidos opacos. A luz do laser de excitação incide em um pequeno volume da amostra, no ponto de foco de uma lente, interagindo com o material e criando um sinal Raman que, como já mencionado, é espalhado em todas as direções. Uma parte significativa do sinal espalhado é enviada para trás e pode ser coletada pela mesma lente que é usada para o foco do laser na amostra. O sinal Raman é separado do laser de excitação por um filtro óptico (filtro “*notch*”) e direcionado para uma segunda lente através de uma pequena fenda (“*slit*”). Assim, apenas o sinal Raman que se origina do ponto de foco da lente pode chegar ao detector, enquanto a luz remanescente, de sítios fora de foco, é bloqueada.

Idealmente, o foco do laser deve estar na superfície da amostra quando são opacas, ou ligeiramente abaixo da superfície, e dentro dela para amostras transparentes. A posição de foco mais profundo resulta em melhora na dispersão da luz do laser e do sinal Raman criado, notadamente para materiais muito transparentes que possuem um sinal Raman fraco.

Ao trabalhar com um recipiente como suporte, por exemplo um frasco de vidro ou de plástico, sinais indesejados originárias do próprio material podem surgir, como autofluorescência e/ou sinais Raman destes, que podem ser minimizados pela posição do foco, ou seja, posicionando a lente ou o recipiente de maneira a focalizar no seu interior.

Para demonstrar a influência da posição do foco do laser em relação à amostra, a empresa Anton Paar GmbH publicou um documento que apresentou espectros de um tubo de vidro padrão preenchido com benzonitrila, os quais foram obtidos em diferentes posições do tubo (Anton Paar, 2018). Como medida para a magnitude do sinal, a intensidade de um pico Raman relevante foi plotada para diferentes posições da amostra. Nos gráficos de intensidade das Figuras 18 e 19 podem ser observados o comportamento da solução química irradiada e o efeito da posição do foco na coleta dos espectros, mostrando o comportamento do sinal Raman frente às mudanças da posição do foco.

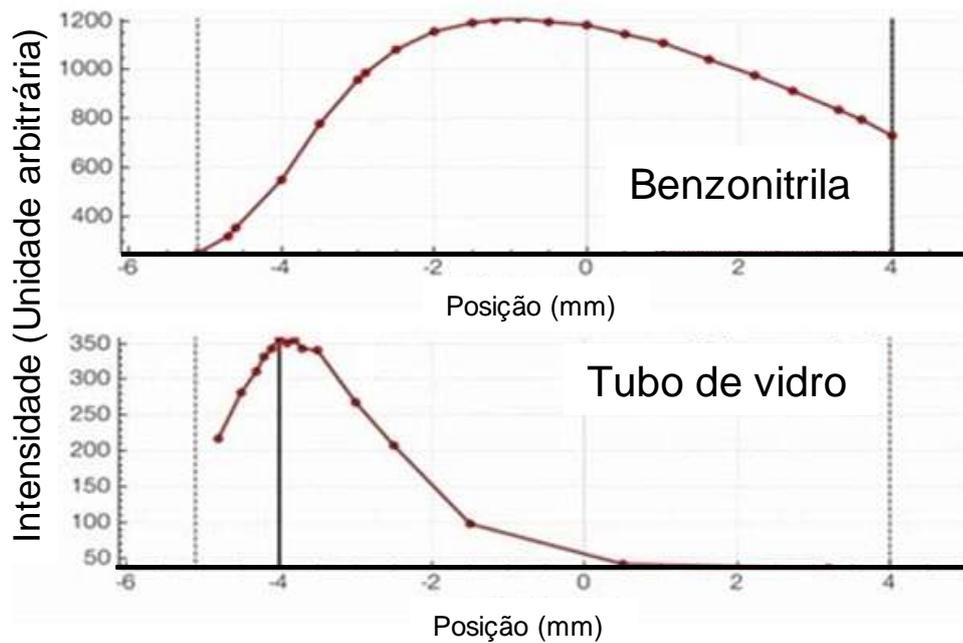


Figura 18 – Plotagem da intensidade de sinal de uma amostra transparente de benzonitrila e do recipiente de vidro em função da posição do foco do laser, estando a posição zero situada no centro do frasco. Fonte: Anton Paar (2018).

As respectivas posições do foco da lente em função da incidência na amostra são mostradas, como exemplo para um frasco porta amostras de vidro, conforme mostrado na Figura 19.

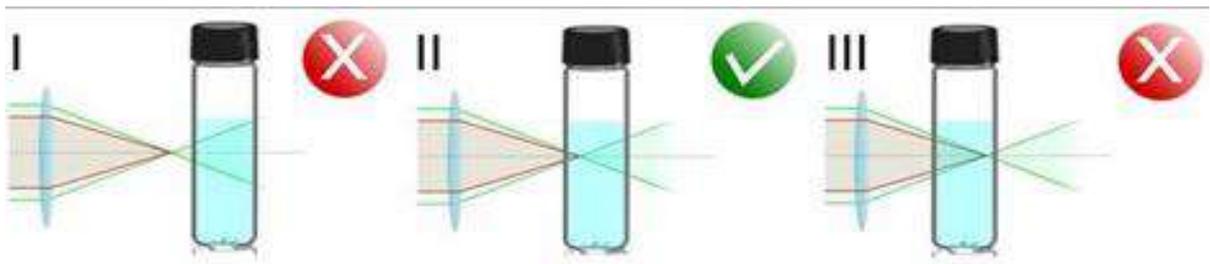


Figura 19 – Diferentes posições da incidência da luz em uma amostra líquida em tubo porta-amostras de vidro, em relação à ponta de fibra do foco do laser. Fonte: Anton Paar, 2018.

Em relação à Figura 19, o desenho I mostra a captura de um sinal intenso proveniente da emissão do vidro, que ocorre na faixa espectral entre 1000 e 2000 cm^{-1} . O sinal Raman originado da amostra é bloqueado pela fenda, já que o foco da lente está sobre a parede, e diminui até que desapareça a uma grande distância. Já no desenho II, com o foco logo após a parede do vidro, o sinal Raman obtido aumenta de intensidade, uma vez que o caminho de volta do sinal capturado

é curto, configurando uma posição ótima de coleta de dados. No desenho III, o foco do laser encontra-se profundamente dentro da amostra. Mesmo que o líquido seja transparente, parte da radiação do laser é espalhada elasticamente ou absorvida em seu caminho para o foco e, portanto, pode contribuir menos para o processo de espalhamento Raman. Além disso, o sinal Raman do ponto de foco tem que viajar todo o caminho de volta através da benzonitrila, e pode ser espalhado ou absorvido também. Essa diminuição do sinal é ainda mais pronunciada para amostras opacas. Em suma, o sinal não é ideal, pois a intensidade total do laser de excitação não atinge o foco e porções do sinal Raman são perdidas.

3.5.3. Ensaio com diferentes porta-amostras

Vários modelos de porta-amostras foram testados fim de verificar o comportamento de cada um destes para uma melhor qualidade na coleta dos espectros. Estes suportes de alumínio foram fabricados especialmente para este trabalho sendo testados dois modelos com características diferentes: um com orifícios com fundo chato e o outro com orifício de fundo côncavo, a fim de verificar se esta característica poderia influenciar na qualidade dos espectros coletados. Amostras de soro foram pipetadas em cada um destes suportes de alumínio (Figuras 20, 21 e 22) com orifícios de volumes variados, seguindo o descrito em literatura (Silveira *et al.*, 2017), sendo realizados vários testes de qualidade do sinal.

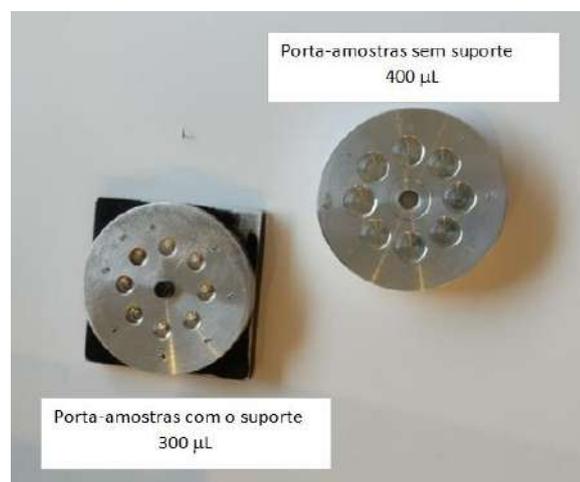


Figura 20 – Dois modelos de porta-amostras em alumínio com oito orifícios, com volumes de 300 e 400 µL.



Figura 21 – Porta-amostras em alumínio com oito furos, com volume de 80 μL .



Figura 22 – Porta-amostras em alumínio anodizado preto-fosco, com volume de 400 μL .

Também foram realizadas análises de desempenho de outros tipos de porta-amostras, de diferentes materiais, para verificar o comportamento do espectro Raman em cada um destes suportes. A Figura 23 mostra uma placa de Kline, nome dado a placas escavadas utilizadas para realizar o teste laboratorial de VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*), exame de triagem para o diagnóstico laboratorial da sífilis. O porta-amostras, confeccionado com vidro, mede 60 x 80 mm, possui 12 cavidades polidas com 16,0 mm de diâmetro e 1,75 mm de profundidade, e 5 mm de espessura.



Figura 23 – Porta-amostras tipo placa de Kline, em vidro, com volume de 300 μL .

Outro ensaio foi realizado com microplaca de microtitulação feitas de poliestireno de alta transparência, de fundo chato e com 96 orifícios conforme mostrado na Figura 24. Estas placas são resistentes a temperaturas entre $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+90\text{ }^{\circ}\text{C}$, e utilizadas em laboratórios de análises clínicas para análises de microbiologia, sorologia, técnicas moleculares, absorvância, ensaios enzimáticos (EIA – “*enzimatic immuno assay*” e ELISA – “*enzyme-linked immunosorbent assay*”), bem como no transporte e armazenamento de amostras.



Figura 24 – Porta-amostras tipo microplaca de microtitulação, em poliestireno, com volume de $100\ \mu\text{L}$.

Os testes com os porta-amostras foram realizados nos espectrômetros #1 e #3, em duplicata, verificando a qualidade dos espectros obtidos e a repetibilidade entre os mesmos. Foram realizadas 8 medidas (16 coletas) em cada porta-amostras, sendo que o que apresentou melhores resultados foi o confeccionado em alumínio com 8 orifícios de $400\ \mu\text{L}$ mostrado na Figura 20.

3.6. CONFECÇÃO DE CURVA DE LINEARIDADE POR ADIÇÃO DE GLICOSE AO SORO

A fim de verificar a possibilidade de melhora da qualidade (aumento da RSR) dos espectros para o analito GLI, um conjunto de amostras de soro foi separado e foi adicionada uma quantidade de glicose preparada a essas amostras, com diluições conforme segue.

Inicialmente uma solução de glicose (em água) foi diluída em soro “*pool*” para ser testada no espectrômetro #3. Esta solução de glicose foi assim preparada: 1 parte de solução de glicose comercial de $50,0\ \text{g/dL}$ (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi adicionada a 9 partes de água destilada (diluição $1/10\ \text{v/v}$), obtendo-se uma solução de glicose em água com concentração de $5,0\ \text{g/dL}$ (solução A). Uma parte

desta solução A foi adicionada a 9 partes de uma amostra de soro proveniente de um “pool” de soros, com valor de concentração determinada de 114 mg/dL de GLI (diluição 1/10 v/v), obtendo-se uma amostra “pool” com glicose adicionada de concentração 603 mg/dL (1/10 da solução A – 500 mg/dL de glicose somado com 9/10 do soro “pool” – 103 mg/dL de glicose), sendo arredondado para 600 mg/dL (solução B).

Foram então preparadas soluções de soro com diferentes concentrações (curva de linearidade) mediante diluições da amostra “pool” com a solução B, conforme Tabela 8. Destas amostras do “pool” com diferentes diluições da solução B, foram obtidos os espectros a fim de encontrar uma região de concentrações adequadas que pudesse oferecer aumento na RSR e conseqüente melhora na correlação entre as concentrações reais e previstas do analito GLI, já que em condições normais o sinal da glicose no soro é muito baixo e a correlação é fraca (correlações de GLI – $r = 0,105$; $0,370$ e $0,270$, para os espectrômetros #1, #2 e #3, respectivamente). Os espectros destas amostras (amostra “pool” com diferentes diluições do soro “pool” glicosado, referindo-se à solução B da Tabela 8) foram obtidos no espectrômetro #3 a fim de verificar a linearidade das concentrações de glicose, visando encontrar uma região de valores de “glicose adicionada” que pudesse oferecer um resultado melhor na correlação entre concentração real *versus* predita. A coleta dos espectros foi feita em duplicata.

Tabela 8 – Diluições do soro “pool” (concentração de 114 mg/dL de glicose) com soro “pool” glicosado (concentração 600 mg/dL – solução B) para obtenção da curva de linearidade da glicose em soro.

Amostra	Soro “pool” (114 mg/dL)		Soro “pool” glicosado (600 mg/dL) – solução B		Concentração final
	Volume (mL)	Concentração (mg/dL)	Volume (mL)	Concentração (mg/dL)	Concentração (mg/dL)
1	0,9	103	0,1	60	163
2	0,8	91	0,2	120	211
3	0,7	80	0,3	180	260
4	0,6	68	0,4	240	309
5	0,5	57	0,5	300	358
6	0,4	46	0,6	360	406
7	0,3	34	0,7	420	455
8	0,2	29	0,8	480	510
9	0,1	11	0,9	540	552
10	0,0	0,0	1,0	600	600

A solução de glicose comercial (50,0 g/dL) foi diluída 1:1 v/v em água destilada, para uma concentração de 25,0 g/dL de glicose, a fim de obter-se uma solução do soro “pool” glicosado de concentração conhecida de 2,60 g/dL (solução C). Esta solução foi obtida a partir de 1 parte da solução de glicose 25,0 g/dL e 9 partes da solução do soro “pool” de 114 mg/dL (103 mg/dL), resultando em um soro glicosado com concentração de 2,60 g/dL (por arredondamento). A partir da solução C foram feitas diluições com as amostras de soro do experimento para elevar a concentração de glicose em cada soro a ser analisado (amostras com glicose adicionada) para valores na faixa de 300 a 450 mg/dL, considerada uma região linear para a concentração de glicose em soro (conforme Figura 32 adiante), sendo a concentração final de cada amostra do experimento constituída por 1/10 de soro glicosado a 2,60 g/dL (2600 mg/dL) mais 9/10 da concentração (x) da amostra a ser testada ($0,9x$), conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Diluição da amostra de soro “pool” com solução de glicose comercial diluída (25,0 g/dL em água destilada) para a preparação do soro teste com glicose adicionada (soro glicosado).

Amostra	Obtenção da amostra de soro glicosado		
	Concentração (mg/dL)	Volume (mL)	Concentração final (mg/dL)
Soro “pool”	114	0,9	103
Solução de glicose comercial diluída 1/1 v/v em água destilada	$25,0 \times 10^3$	0,1	$2,50 \times 10^3$
Soro pool glicosado – concentração final (por arredondamento)			$2,60 \times 10^3$
	Adição do soro glicosado às amostras de soro de teste		
	Concentração (mg/dL)	Volume (mL)	Concentração final (mg/dL)
Soro pool glicosado	$2,60 \times 10^3$	0,1	260
Soro de teste*	x^{**}	0,9	$0,9x + 260$

* amostras com glicose determinada pelo método espectrofotométrico

** concentração de glicose obtida pelo método espectrofotométrico

3.7. TRATAMENTO DE DADOS

Os espectros Raman coletados em cada espectrômetro foram pré-processados na seguinte ordem: remoção manual dos picos de raios cósmicos, correção da linha de base (remoção da fluorescência de fundo e luz difusa – “stray

light”) mediante ajuste e subtração de um polinômio de ordem 6 para o espectrômetro #2 e de ordem 7 para os espectrômetros #1 e #3, e normalização de cada espectro pela área sob a curva (“1-norm” ou “taxicab norm”) (Bispo *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2015). Para o espectrômetro #3, houve também suavização do ruído de alta frequência por um filtro do tipo Savitzky-Golay (SG) de ordem 2 e 11 pontos de interpolação. A suavização SG usada para corrigir o ruído espectral foi proposta por Savitzky e Golay, que define pontos em um intervalo e ajusta um polinômio simetricamente em torno do ponto médio, substituindo-o pelo valor determinado pelo polinômio que foi ajustado. O processo é repetido para todos os pontos do espectro, com a janela acompanhando o entorno do ponto. É importante que o tamanho da janela seja ajustado para eliminar o máximo de ruído sem prejudicar as informações que se procura analisar, ou seja, sem alterar a forma ou intensidade dos picos Raman, gerando modelos mais satisfatórios para a análise (Rinnan *et al.*, 2009). Este filtro foi empregado unicamente nos espectros coletados no espectrômetro #3, por haver demonstrado a melhor resposta sem utilização do filtro SG, e verificar se a aplicação desta técnica de filtragem poderia melhorar a qualidade do sinal.

3.8. MODELO DE REGRESSÃO MULTIVARIADO PARA QUANTIFICAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DOS ANALITOS

Instrumentos analíticos, como os espectrômetros Raman, produzem grandes quantidades de dados (espectros) com múltiplas variáveis (deslocamentos Raman) a partir de uma quantidade relativamente pequena de amostras. Estas variáveis podem ser reduzidas para então serem convertidas em informação útil. A quimiometria é uma ferramenta que tem a capacidade de maximizar a qualidade da informação acessível a partir das amostras, através da identificação de dados aparentemente não relacionados e irrelevantes (como ruído, por exemplo), ou com muitas variáveis (sinais que não se relacionam com as variações na amostras analisadas), e sua conversão em informações relacionadas e relevantes sobre o estado de um sistema químico (Ferreira, 2015; Biancolillo e Marini, 2018; Calvo *et al.*, 2018), sendo que o método de regressão PLS é o mais popular e o mais utilizado (Ferreira, 2022).

Métodos multivariados quantitativos como a regressão PLS são aplicados aos espectros a fim de se encontrar as diferenças espectrais que estão relacionadas

com as variações na composição bioquímica das amostras. A PLS é uma técnica de regressão utilizada para modelar a relação entre uma variável dependente ou de resposta Y (por exemplo, a concentração), e um conjunto de variáveis independentes ou de entrada X (por exemplo, os picos dos espectros), permitindo identificar quais fatores melhor modelam a variável dependente Y a partir da covariância entre Y e X , permitindo trabalhar com conjuntos de dados onde haja variáveis altamente correlacionadas mesmo com presença de ruído aleatório considerável ou outra informação não correlacionada. Neste sentido, a PLS identifica novas variáveis que maximizam a correlação entre Y e X via matriz de covariância.

A construção do modelo baseia-se em variáveis latentes (LVs), no qual cada LV é definida como uma combinação linear das variáveis originais das matrizes X (espectros) e Y (concentrações), implicando encontrar um conjunto de vetores-base para os dados espectrais e outro conjunto de vetores-base para os dados de concentração, para então relacioná-los um com o outro pela correlação entre Y e X (Ferreira, 2022).

Portanto, em um modelo de regressão multivariado como a PLS, é necessário determinar quantas e quais LVs levam à maior correlação linear entre as concentrações previstas pela regressão PLS e as concentrações reais do analito analisado, de tal forma que ambos se aproximem da linha diagonal (significando maior coeficiente de determinação – R^2 ou correlação – r e menor erro RMSEcv), sendo que o valor de R^2 representa a proporção da variabilidade na variável de resposta explicada pela variável preditora (valor entre 0 e 1) e o valor do erro RMSEcv representa o erro da concentração predita frente à concentração real em validação cruzada (Barton *et al.*, 2022). A predição é alcançada extraído-se as LVs de um conjunto de dados originais ou de treinamento e as modelando em termos de sua “quantidade” em cada uma das amostras, aplicando então as variáveis modeladas no próprio conjunto original (validação cruzada) ou em um novo conjunto de dados de validação (validação de fato), tornando-se o método de escolha para a análise multivariada de dados espectrais devido à alta robustez do modelo.

O modelo de quantificação baseado na regressão PLS utilizou os espectros normalizados (matriz X) e as concentrações dos analitos do soro obtidos através da metodologia padrão ouro (matriz Y). O software Chemoface (versão 1.64, UFLA, Lavras, MG, Brasil, <http://www.ufla.br/chemoface>) (Nunes *et al.*, 2012), desenvolvido em ambiente MATLAB, foi utilizado para a criação dos modelos de regressão PLS e

obtenção das concentrações previstas dos analitos a partir dos espectros Raman das amostras de soro e suas concentrações pelo método espectrofotométrico. Como foram realizados ensaios Raman em três espectrômetros, o modelo obtido forneceu os seguintes parâmetros: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro médio de validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; e número de LVs = número de variáveis latentes que melhor ajustou o modelo para cada espectrômetro. Para isso, utilizou-se o método de validação cruzada “deixar um de fora” (“*leave-one-out*”), no qual um espectro é removido, o modelo de regressão é construído usando $n - 1$ espectros, e o modelo é então validado (testado) nesse espectro deixado de fora, obtendo a concentração prevista ou estimada para este espectro. Em seguida, o processo de construção do modelo e teste é repetido sucessivamente para todas as amostras (cada um dos espectros é deixado de fora, o modelo é criado e o espectro da amostra deixada fora é testado).

No modelo PLS, os valores de concentração dos analitos por espectrofotometria foram considerados como concentração real. Os valores de concentrações previstas pelo modelo para cada analito dependeram do número de LVs consideradas, e o número de LVs foi escolhido como o número que resultou em maior valor do R^2 e menor valor do RMSEcv quando plotadas as concentrações reais *versus* as concentrações previstas.

Os analitos de melhor desempenho nas correlações tiveram seus espectros modelados via análise discriminante por regressão PLS (PLS-DA) visando classificá-los em grupos “Normal” ou “Alterado”. Para tal, o software Chemoface foi empregado com validação “deixar um de fora”, onde os espectros representam as variáveis independentes (X) e os grupos a qual cada amostra pertence (Normal – grupo 1 ou Alterado – grupo 2), baseados na faixa de referência de concentração do analito, representam as variáveis dependentes (Y). A tabela de confusão com os resultados da classificação dos espectros em cada um dos grupos para cada analito foi também obtida.

3.9. CLASSIFICAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS DE INTERESSE

A utilização de modelos de aprendizagem de máquina e inteligência artificial tem se tornado cada vez mais comum em diversas áreas, como saúde, finanças, marketing e tecnologia. No entanto, avaliar a eficácia desses modelos é fundamental

para garantir resultados precisos e confiáveis. A matriz de confusão é uma ferramenta importante na avaliação do desempenho de modelos de classificação como a PLS-DA. A matriz de confusão é uma tabela que permite a visualização do desempenho de um modelo classificatório, apresentando o resultado da classificação, comparando as previsões do modelo com os valores reais dos dados, sendo possível identificar erros e acertos da classificação, e assim comparar modelos com diferentes variáveis ou parâmetros de modelamento e mesmo diferentes modelos, ajudando a avaliar a eficácia e acurácia da classificação.

Na avaliação do desempenho de modelos de classificação, a matriz de confusão é uma ferramenta fundamental, que demonstra não apenas o número de acertos, mas também os tipos de erros que o modelo está cometendo. Na medição de métricas, a matriz de confusão possibilita calcular diversos elementos que ajudam a quantificar o desempenho do modelo.

A matriz de confusão é uma tabela em que as linhas representam as classes reais e as colunas representam as classes previstas pelo modelo, com verdadeiros positivos (VP), que são os casos em que o modelo previu corretamente a classe positiva, falsos positivos (FP), que são os casos em que o modelo previu incorretamente a classe positiva (que na verdade, era negativa), verdadeiros negativos (VN), que são os casos em que o modelo previu corretamente a classe negativa, e falsos negativos (FN), sendo os casos em que o modelo previu incorretamente a classe negativa (que na verdade, era positiva). Cada célula da matriz contém o número de observações correspondente a uma combinação de classe real e de classe prevista.

A sensibilidade ou "*recall*" mede a proporção de verdadeiros positivos em relação ao total de elementos que realmente são positivos ($VP / (VP + FN)$) e indica a capacidade do modelo de encontrar todos os exemplos positivos. A precisão mede a proporção de verdadeiros positivos em relação ao total de elementos previstos como positivos ($VP / (VP + FP)$) e indica a qualidade das previsões positivas do modelo. A acurácia mede a proporção de previsões corretas em relação ao total de previsões ($(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$) e indica a capacidade geral do modelo de fazer previsões corretas. O F1-escore é a média harmônica entre precisão e sensibilidade e fornece um equilíbrio entre as duas métricas. É útil quando há um desequilíbrio significativo entre as classes.

Essas métricas ajudam a avaliar o desempenho do modelo e identificar possíveis melhorias. Se o modelo apresentar um alto número de FP, pode ser necessário ajustar as variáveis ou os parâmetros do modelo ou revisar como os dados estão sendo processados.

3.10. INFORMAÇÕES SOBRE O SERS

A técnica SERS intensifica o sinal Raman ao medir o espalhamento de biomoléculas adsorvidas sobre superfícies metálicas nanoestruturadas, geralmente de ouro e prata, e a interação da molécula com o campo elétrico ampliado pela superfície causa um aumento significativo no sinal Raman, tornando-o várias ordens de magnitude maior do que o sinal Raman dito normal e permitindo a identificação e quantificação das moléculas, mesmo em baixas concentrações. As principais barreiras para a aplicação da técnica Raman por SERS estão relacionadas à baixa sensibilidade da técnica Raman com a eventual interferência da fluorescência, a dependência do comprimento de onda de excitação que necessita estar adequado em função do tamanho da nanoestrutura metálica, a natureza da própria amostra (sua polarizabilidade), e a demorada e custosa preparação do substrato, pois o mesmo necessita ser funcionalizado para ocorrer a adsorção.

Stosch *et al.* (2005) aplicaram SERS com excitação de 514,5 nm para determinar a concentração de creatinina no soro, adicionando creatinina marcada isotopicamente ($2\text{-}^{13}\text{C}$, $2,3\text{-}^{15}\text{N}_2$) como padrão interno, usando um coloide de nanopartículas de prata como substrato SERS. Van Duyne *et al.* (2006) desenvolveram sensores de antraz e glicose baseados em SERS usando substrato de filme de prata sobre nanoesferas (AgFON) em esporos de *Bacillus subtilis*, em lugar de *Bacillus anthracis*, que são mais patogênicos. Para a detecção de glicose em plasma bovino, uma camada de partição mista de decanotiol/mercaptohexanol foi usada como sensor para detectar a glicose pela superfície do substrato AgFON, para ser quantificada. Stokes *et al.* (2008) relataram um estudo baseado em SERS usando vários comprimentos de onda de excitação (514,5, 632,8 e 785 nm) aplicados em soluções aquosas de ácido fólico usando nanopartículas de prata. A aplicação de ácido fólico como conjugado para direcionar molécula para terapias anticancerígenas é um passo importante na ação de medicamentos. É possível

confirmar a presença do conjugado de ácido fólico em uma célula usando microscopia confocal, mas a aplicação da SERS permitiu quantificá-lo dentro deste ambiente e monitorar a absorção pelas células, minimizando o risco de fotodissociação e aumentando a biocompatibilidade. Considerando que a concentração de ácido láctico no estado fisiológico é demasiado baixa para ser detectada com espectroscopia Raman tradicional, Hsu e Chiang (2010) aplicaram SERS mediada por nanopartículas de prata coloidal, com excitação de 632.8 nm e 20 mW de potência, para identificação e quantificação rápidas do ácido láctico.

Em 2014, Bonifacio *et al.* realizaram um estudo sobre as deficiências do SERS e discutiram a falta de informações publicadas em relação a: (a) o efeito do processamento da amostra (como filtração) e parâmetros experimentais (tais como comprimento de onda de excitação, coloide metálico, etc.); b) a comparação do soro com o plasma com vários tipos de anticoagulantes; e (c) a variabilidade espectral entre os indivíduos devido à variação da composição da amostra. Os autores concluíram que os espectros SERS do soro ultrafiltrado e do plasma foram prejudicados por dois metabólitos altamente variáveis pela idade e pelo sexo do paciente, o ácido úrico e a hipoxantina, e que os problemas inerentes à reprodutibilidade tiveram profundas consequências no uso do SERS como elemento diagnóstico. (Bonifacio *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. ESCOLHA DO PORTA-AMOSTRAS

Os espectrômetros Raman portáteis utilizados na pesquisa atendem à análise de diversos compostos, independentemente da amostra ser sólida, líquida ou em pó, possuindo suportes de amostras (porta amostras) apropriados para cada equipamento. Podem usar tubos com vários diâmetros e volumes, placas planas com orifícios, ou analisar diretamente amostras sólidas, como pó ou comprimidos, já que um dos equipamentos vem equipado com um suporte de amostras com ímãs e esse suporte pode ser posicionado de forma rápida e precisa no instrumento, permitindo a medição imediata de uma nova amostra sem necessidade de realinhar o foco do laser.

O foco manual em amostras finas ou opacas com um sinal Raman fraco pode ser difícil de obter, como acontece no espectrômetro portátil #1, mais antigo. A característica “autofoco” do espectrômetro portátil #2 elimina a complexidade da rotina de medição. Esta característica é capaz de encontrar automaticamente o ponto focal com o melhor sinal Raman, garantindo a reprodutibilidade, tornando a coleta de dados menos dependente do usuário. A Figura 25 mostra os componentes mecânicos e os porta-amostras utilizados para colocar as amostras em estudo.

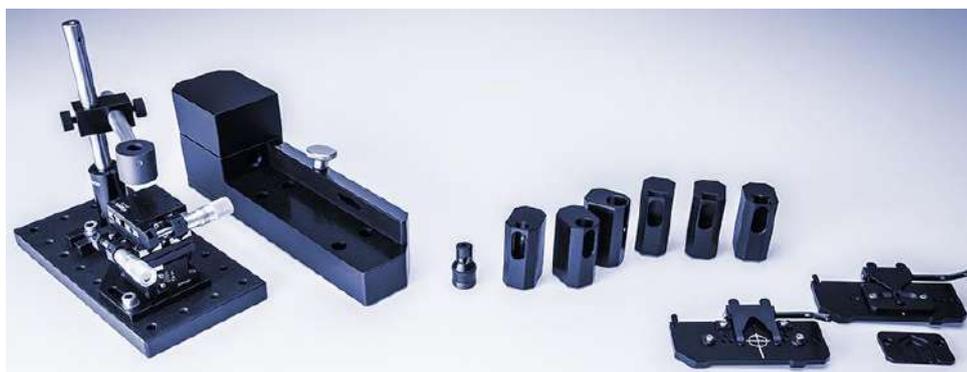


Figura 25 – Componentes mecânicos utilizados no espectrômetro #2 relacionados à colocação da amostra a ser analisada, conforme apresentação no manual do aparelho e site do fabricante. Fonte: Azo Nano: <https://www.azonano.com/equipment-details.aspx?EquipID=2250>

Entretanto, para uma rotina laboratorial de triagem de analitos, este sistema se torna pouco prático por ser de medição individual e não automatizada, o que provoca demora no atendimento, sendo prejudicial ao objetivo desta pesquisa. Desta forma, ante a necessidade de agilizar os processos analíticos, foram testados porta amostras comerciais de laboratórios de análises clínicas, como os mostrados nas Figuras 23 e

24, que resultaram em espectros de baixa qualidade e não reprodutíveis pelo método utilizado. No caso da placa de Kline com capacidade de 300 μL , a refletância e emissão fluorescente do vidro não permitiu a reprodutibilidade do ensaio, e os resultados das repetições foram muito díspares e não confiáveis para o trabalho.

O ensaio com as microplacas de microtitulação de poliestireno de alta transparência, de fundo chato e com 96 orifícios com volume de 360 μL , as quais poderiam auxiliar grandemente na triagem bioquímica em centros de saúde, revelou dificuldade para centralizar o laser no orifício contendo a amostra dada as pequenas dimensões do diâmetro do orifício. Há também a impossibilidade de acionamento do sistema laser do equipamento com a tampa protetora aberta (uma medida de segurança), o que prejudica a medição do espectro. Além do mais, não existe espaço interno suficiente no espectrômetro para acessar cada um dos 96 orifícios existentes na placa, já que a placa atende outra finalidade.

Foram realizados testes com os porta-amostras confeccionados em alumínio em vários volumes, conforme mostrado nas Figuras 20, 21 e 22, um dos quais foi tratado superficialmente com anodização preta fosca para testar a diminuição da refletância da radiação eletromagnética do laser. Ao contrario do que se pensou, o porta amostras com anodização preta fosca mostrou os espectros replicados muito diferentes para várias amostras, não confirmando a reprodutibilidade dos ensaios, não se comportando adequadamente nos testes, pelo que foi descartado seu uso no trabalho.

Dentre os porta-amostras de alumínio confeccionados, os que têm fundo côncavo (80, 300 e 400 μL) não foram reprodutíveis, provavelmente devido à não planicidade do fundo, que modifica o volume de amostra iluminada se a posição do foco do laser não estiver centralizada com relação ao diâmetro do furo. Já o porta-amostras com orifício com volume de 400 μL e fundo chato foi que teve maior reprodutibilidade em repetições de medição Raman e foi utilizado na rotina dos testes para os três espectrômetros, com os resultados mostrados a seguir.

4.2. ESPECTROS RAMAN DO SORO

A Figura 26 apresenta os espectros Raman médios normalizados dos soros, obtidos em cada um dos espectrômetros, evidenciando os picos característicos dos constituintes do soro na região espectral de 400 a 1800 cm^{-1} . Apesar das amostras de soro apresentarem constituição semelhante, com evidenciação de picos de proteínas (principalmente albumina), é possível observar diferenças na qualidade do sinal e diferentes respostas espectrais para cada equipamento. A qualidade do

espectro do espectrômetro #3 é visivelmente melhor que a dos equipamentos portáteis (#1 e #2), e a RSR para o pico de proteína na região de 1450 cm^{-1} (modos de vibração de deformação/dobra CH_2/CH_3) é de 65, 65 e 110 para os espectrômetros #1, #2 e #3, respectivamente. A RSR foi obtida medindo-se o DP do ruído na região espectral do “vale” em torno de 1500 cm^{-1} e determinando-se a razão entre a intensidade do pico em 1450 cm^{-1} e o DP.

Os picos nos espectros Raman de soro indicam a presença de determinados componentes dessa amostra, sobretudo proteínas (principalmente albumina e globulinas), e a intensidade desses picos está relacionada à concentração relativa desses componentes. Uma descrição detalhada das atribuições destes picos pode ser vista nas seguintes referências: Borges *et al.* (2015), Silveira *et al.* (2017), Giansante *et al.* (2022), e também nas referências citadas por tais estudos.

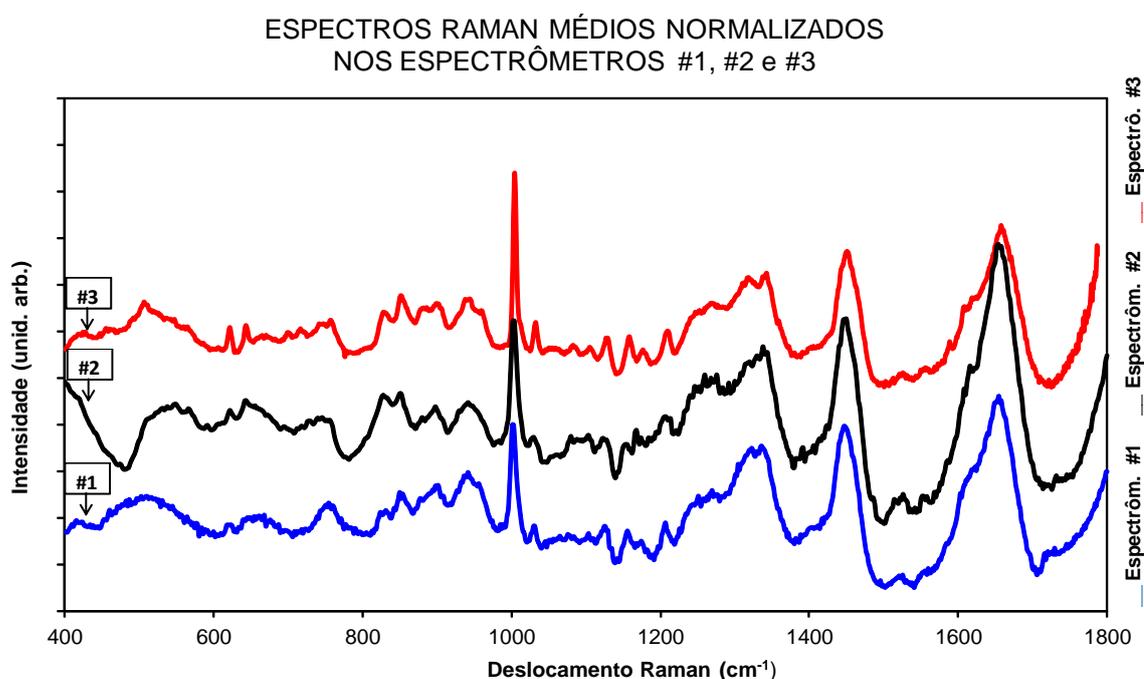


Figura 26 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro humano obtidos com cada um dos três espectrômetros Raman. O número de amostras de soro analisadas com cada espectrômetro foi: 42, 100 e 51 para os espectrômetros #1, #2 e #3, respectivamente. O espectro do espectrômetro #3 é visivelmente melhor, e a sua RSR foi quase o dobro da RSR dos espectrômetros portáteis.

4.3. PICOS ESPECTRAIS DOS ANALITOS ESTUDADOS

A Figura 27 apresenta o mesmo espectro médio do soro humano conforme Figura 26 com alguns constituintes de soro (colesterol, ureia, creatinina e glicose) marcados e rotulados conforme o estudo de Bispo *et al.* (2013).

Os picos rotulados coincidem com os constituintes do soro citados acima, e alguns deles se sobrepõem aos espectros de outros compostos séricos não citados. Estes picos foram usados para identificar os compostos bioquímicos analisados neste trabalho e que são vistos nos espectros apresentados de soro com concentrações normais e alteradas, onde se observou também a presença de picos típicos de proteínas (principalmente albumina) e outros metabólitos presentes, mas não descritos.

Os picos Raman relacionados com a albumina, que possui uma alta concentração em comparação com os outros componentes bioquímicos do soro (aproximadamente 3,5 a 5,0 g/dL) e corresponde a aproximadamente 3,5 a 4,0% do volume do plasma (Williamson e Snyder, 2016), podem ser vistos a partir dos picos referentes a proteínas em 1004 cm^{-1} (estiramento do anel aromático – principalmente fenilalanina), entre 1100 e 1350 cm^{-1} (amida III), em torno de 1450 cm^{-1} (modos de vibração de deformação/dobra CH_2/CH_3), e por volta de 1660 cm^{-1} (amida I) (Lykina *et al.*, 2017, Talari *et al.*, 2015)

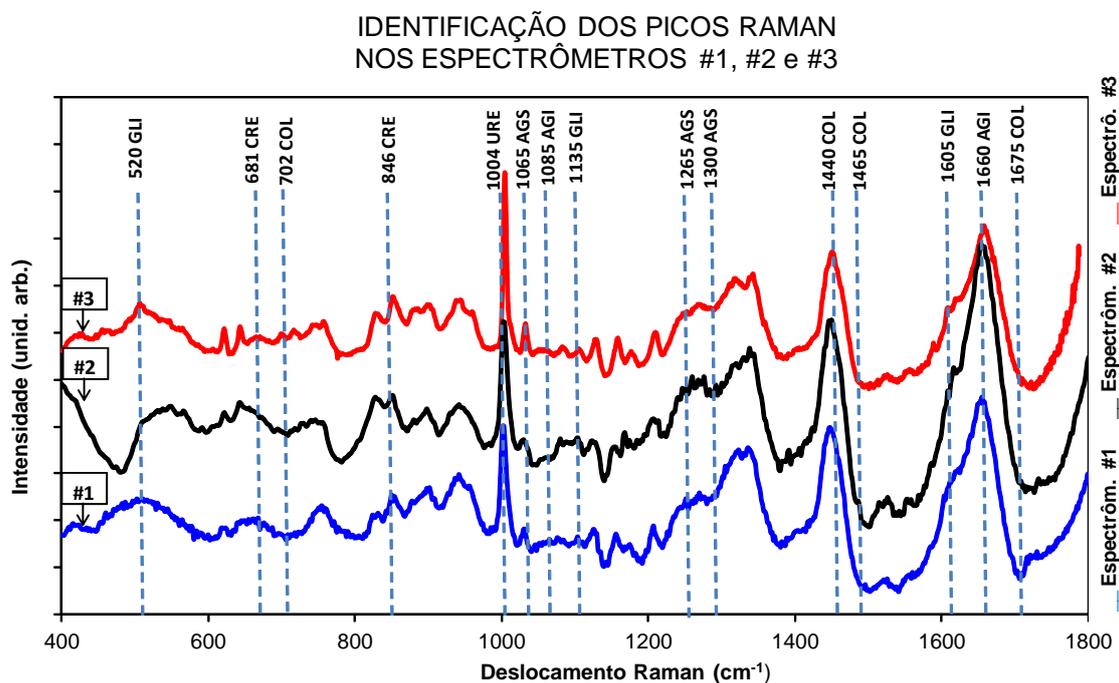


Figura 27 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro humano conforme Figura 26, e indicação das posições dos picos Raman dos constituintes basais: colesterol, ácidos graxos saturados (AGS) e insaturados (AGI) (triglicérides, que têm bandas espectrais características de lipídios), glicose, ureia e creatinina. Os picos rotulados são os encontrados nos espectros dos compostos basais. O espectro sérico apresenta outros picos além dos citados, e reflete sua composição principal de proteínas (principalmente albumina), e de outros metabólitos.

Outros picos mais intensos do soro da Figura 27 e os picos citados (colesterol, ureia, creatinina e glicose), que também são descritos na literatura (Hanlon *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2015; Talari *et al.*, 2015; Saatkamp *et al.*, 2016; Lykina *et al.*, 2017), são mostrados na Tabela 10. Os picos em 702, 1440, 1465 e 1675 cm^{-1} são característicos de colesterol, os picos em 1065, 1265 e 1300 cm^{-1} são característicos de ácidos graxos saturados (principalmente triglicérides), os picos em 1085 e 1660 cm^{-1} são característicos de ácidos graxos insaturados (principalmente triglicérides), o pico em 1004 cm^{-1} é característico de ureia, os picos em 681 e 846 cm^{-1} são característicos de creatinina, e os picos em 520, 1135 e 1605 cm^{-1} são característicos de glicose.

Tabela 10 – Posições e atribuições vibracionais das bandas dos principais picos Raman, alguns deles mostrados na Figura 27 e referidos na literatura.

Posição do pico (cm^{-1})	Analito	Posição do pico (cm^{-1})	Analito
426 e 436	Colesterol	1130	Glicose
520	Glicose	1135	AGS*
555	Colesterol	1160	Carotenoides
608	Colesterol	1265	AGS*
681	Creatinina	1270	AGS*
702	Colesterol	1300 e 1305	AGS* e AGI**
846	Creatinina	1375	Glicose
859	Glicose	1440	Colesterol, AGS* e AGI**
877	AGI**	1465	Colesterol, lipídios
919	Glicose	1525	Carotenoides
1004	Albumina e ureia	1660	AGS*
1065	Glicose, AGS*	1675	Colesterol
1085	AGI**		

* AGS – ácidos graxos saturados

** AGI – ácidos graxos insaturados

4.4. CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS ESTIMADAS PELO MODELO PLS

A Tabela 11 apresenta os valores dos parâmetros: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro da validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; LVs = número de variáveis latentes para os analitos TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI, obtidos após a aplicação do modelo de regressão PLS nos espectros em triplicata das 42 amostras de soro analisadas

no espectrômetro #1, nos espectros em duplicata das 100 amostras de soro analisadas no espectrômetro #2, e nos espectros em duplicata das 51 amostras de soro analisadas no espectrômetro #3, com e sem filtro SG.

Tabela 11 – Valores obtidos no modelo de regressão PLS para cada um dos analitos testados nas amostras de soro, indicando os parâmetros correspondentes: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro da validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; número de LVs = número de variáveis latentes.

Analitos modelados por PLS para cada espectrômetro utilizado						
Parâmetro	Espectrômetro #1					
	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,0859x + 110	-0,0062x + 178	0,138x + 44,3	0,159x + 0,7	0,146x + 24,9	0,0627x + 86,6
RMSEcv (mg/dL)	114	44,7	14,8	0,172	7,01	21,3
R^2	0,0154	0,0002	0,0498	0,0749	0,0733	0,0112
r	0,124	0,045	0,223	0,274	0,27	0,105
Número de LVs	6	4	9	3	5	3
Parâmetro	Espectrômetro #2					
	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,544x + 45,7	0,733x + 46,4	0,169x + 41,0	0,218x + 0,68	0,238x + 24,4	0,475x + 49,5
RMSEcv (mg/dL)	42,9	22,4	12,1	0,17	8,02	40,2
R^2	0,669	0,651	0,128	0,103	0,133	0,137
r	0,818	0,807	0,357	0,321	0,365	0,37
Nº. de LVs	8	9	3	11	6	9
Parâmetro	Espectrômetro #3 sem filtro SG					
	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,583x + 55,6	0,739x + 48,1	0,175x + 43,3	0,285x + 0,787	0,348x + 24,0	0,149x + 82,1
RMSEcv (mg/dL)	42	20,2	14,7	0,891	16,3	36,1
R^2	0,632	0,762	0,0931	0,449	0,524	0,0729
r	0,795	0,872	0,305	0,670	0,723	0,270
Nº. de LVs	4	8	3	9	6	2
Parâmetro	Espectrômetro #3 com filtro SG					
	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,683x + 42,8	0,839x + 29,9	0,262x + 38,2	0,529x + 0,528	0,697x + 11,1	0,336x + 65,1
RMSEcv (mg/dL)	40,7	19,2	14,6	0,703	10,3	31,6
R^2	0,651	0,787	0,139	0,639	0,798	0,254
r	0,806	0,887	0,373	0,859	0,893	0,504
Nº. de LVs	4	8	10	7	9	9

x = variável independente da expressão da regressão

As Figuras 28 a 31 mostram os gráficos de dispersão entre os valores de concentrações reais (método espectrofotométrico – padrão ouro) no eixo das abscissas, e os valores preditos pelo modelo PLS para cada equipamento no eixo das ordenadas. O espectrômetro #3 teve os dados modelados sem e com filtragem SG.

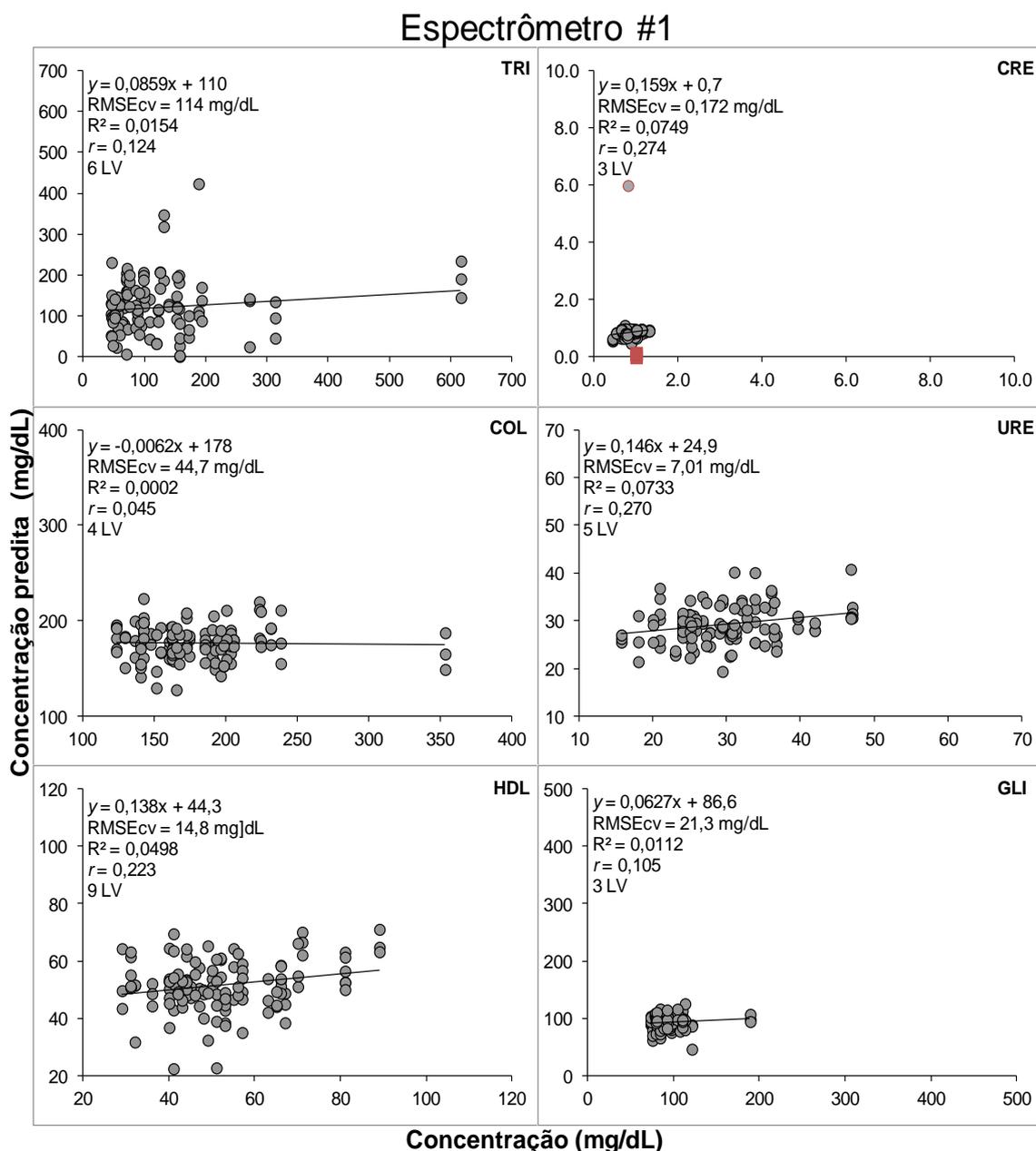


Figura 28 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #1 (portátil, modelo Cora 5200). Os parâmetros y , $RMSEcv$, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem.

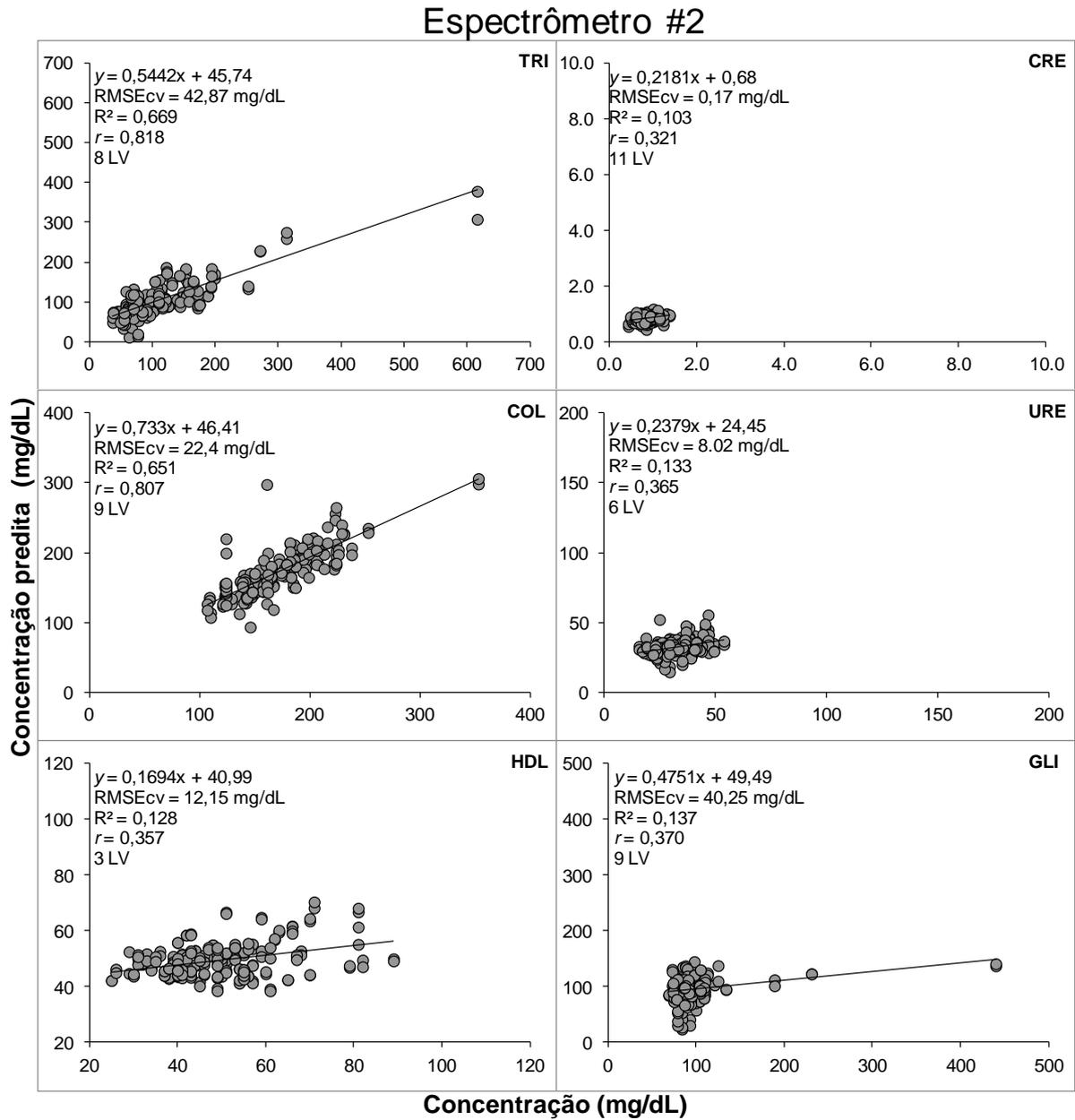


Figura 29 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetros #2 (portátil, modelo Cora 5001-785). Os parâmetros y , $RMSEcv$, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem.

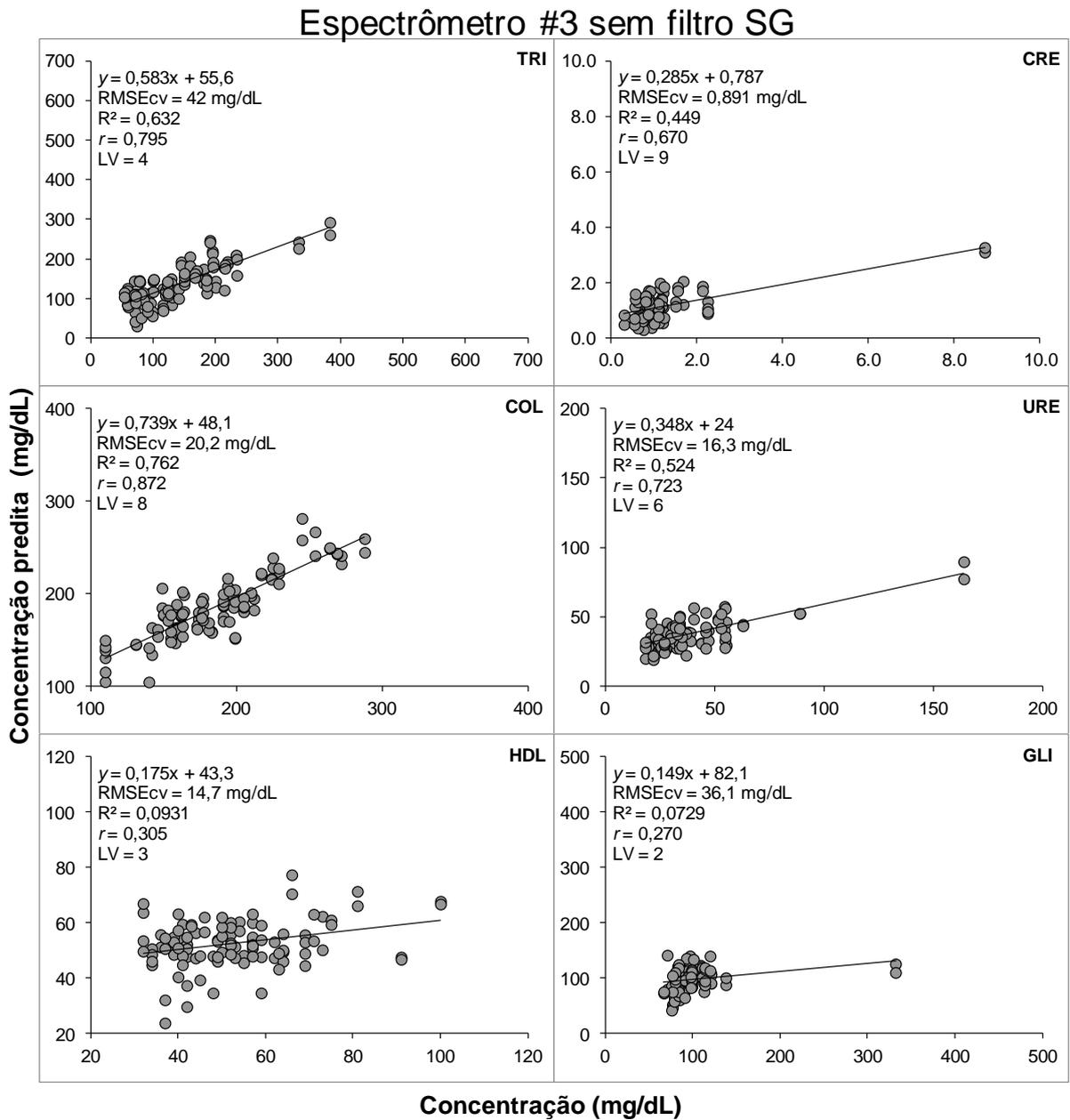


Figura 30 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada, modelo Dimension P-1-HR), sem o filtro SG. Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem.

Espectrômetro #3 com filtro SG

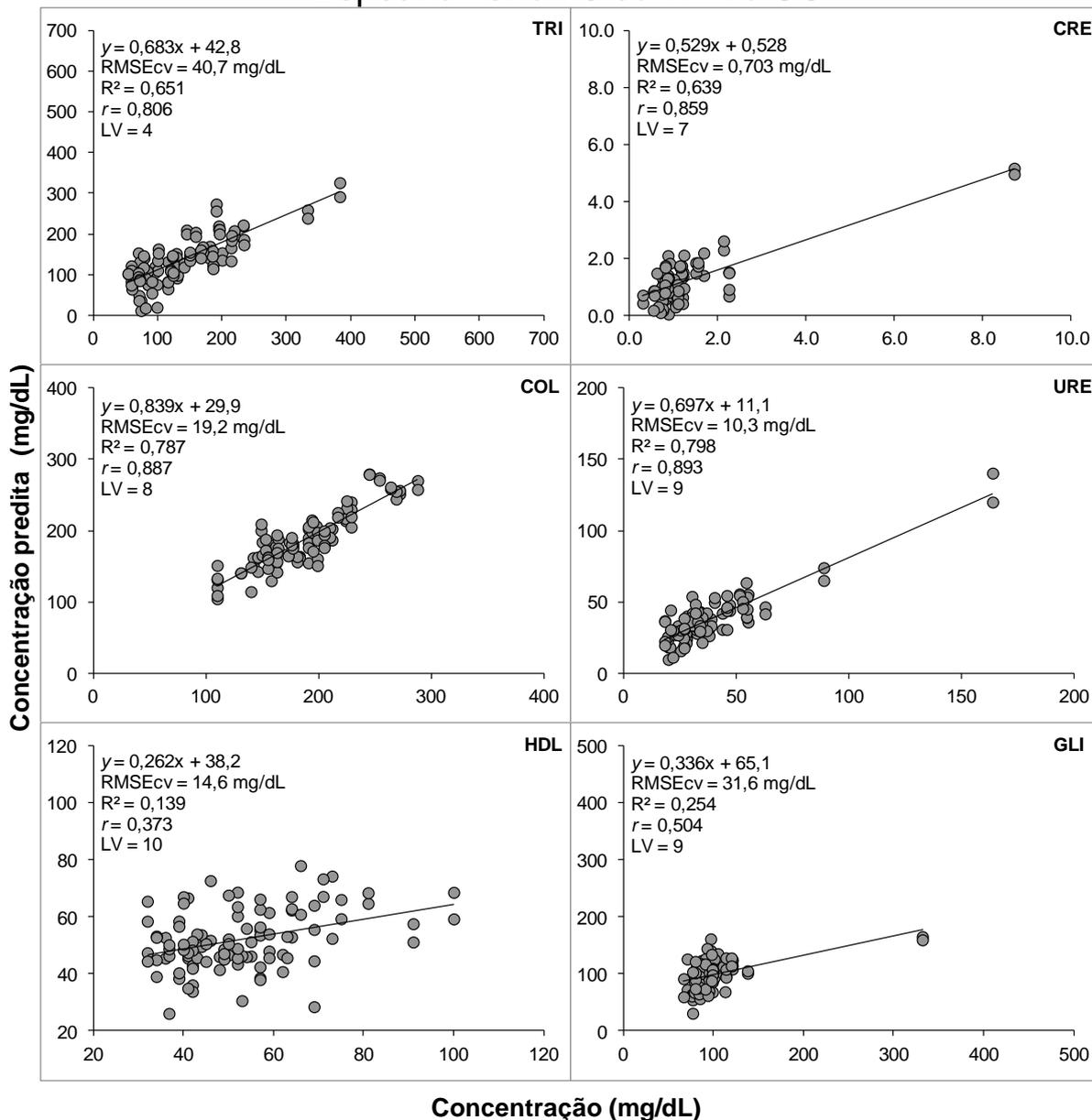


Figura 31 – Plotagem das concentrações dos analitos das amostras de soro obtidos pelo método padrão (espectrofotometria) *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada, modelo Dimension P-1-HR), com o filtro SG. Os parâmetros y , $RMSEcv$, R^2 , r e LVs são apresentados em cada plotagem.

4.5. CURVA DE LINEARIDADE POR ADIÇÃO DE GLICOSE

A Figura 32 apresenta o gráfico de correlação entre as concentrações das diluições do soro “pool” com o soro “pool” glicosado (eixo das abscissas) e os valores preditos pela regressão PLS (eixo das ordenadas). As linhas de tendência do gráfico, traçada nos pontos das diluições do soro “pool” com o soro “pool” glicosado conforme

visto na Tabela 8, mostraram linearidade para os valores de concentração de glicose sanguínea situados aproximadamente entre 300 e 450 mg/dL, o que sugere a possibilidade de melhores resultados de predição da medição da glicose dos soros originais com adição de glicose, embora com aumento no valor do RMSEcv (92,2 mg/dL), conforme mostrado na Figura 32. O valor escolhido para adição de glicose a cada uma das amostras de soro do experimento foi de 260 mg/dL.

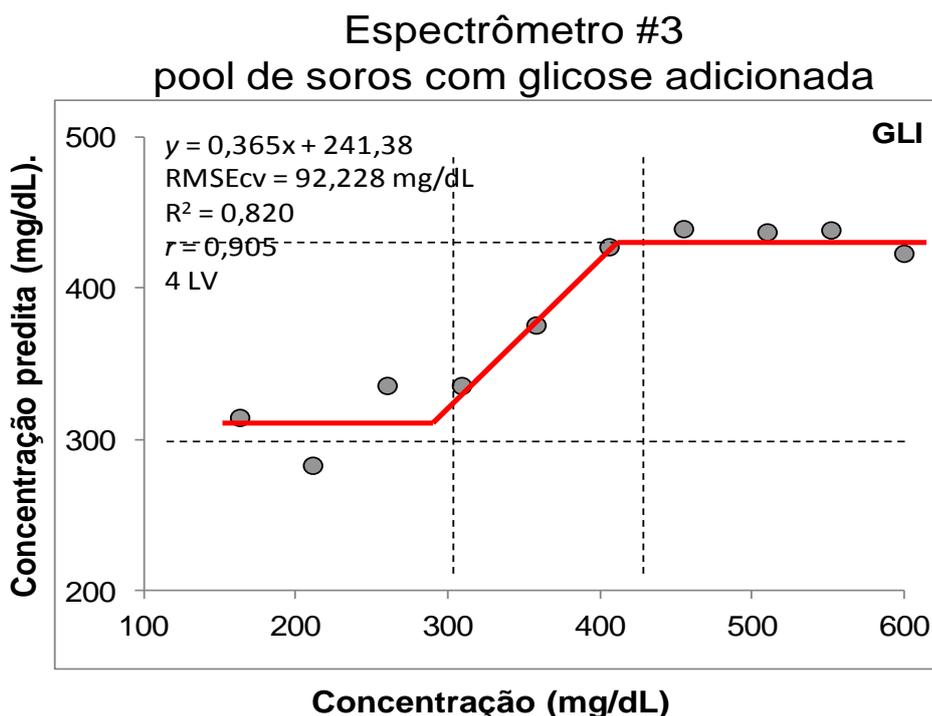


Figura 32 – Gráfico da curva de linearidade da amostra de soro “pool” com a amostra de soro “pool” glicosado, com as correlações das concentrações reais *versus* as concentrações previstas pela regressão PLS utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada).

4.6. CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE SORO COM ADIÇÃO DE GLICOSE ESTIMADAS PELO MODELO PLS

A Tabela 12 apresenta os valores dos parâmetros: y , RMSEcv, R^2 , r e LV para os analitos TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI, obtidos após a aplicação do modelo de regressão PLS nos espectros das 51 amostras do soro testadas com adição de glicose, sem e com aplicação do filtro SG aos espectros, com os valores das concentrações de glicose adicionada sendo usados como variáveis

independentes e os espectros obtidos com o espectrômetro #3 sendo usados como variáveis dependentes no modelo PLS.

Tabela 12 – Valores obtidos das medições dos analitos testados nos espectros das amostras de soro a testar com adição de glicose, sem e com a aplicação do filtro SG, indicando os parâmetros correspondentes: y = expressão da regressão; RMSEcv = erro da validação cruzada; R^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação de Pearson; LV = variáveis latentes para o espectrômetro #3.

Analitos modelados pelo PLS utilizando os espectros do soro teste com adição de glicose e sem filtro SG, no espectrômetro #3.						
Parâmetro	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,659x + 47,2	0,722x + 52,2	0,163x + 44,8	0,266x + 0,873	0,387x + 22,8	0,025x + 333
RMSEcv (mg/dL)	35,1	19	12,8	0,847	14,1	32,4
R^2	0,73	0,759	0,11	0,313	0,561	0,0113
r	0,854	0,871	0,331	0,559	0,748	0,106
Nº. de LVs	5	4	2	9	9	1

Analitos modelados pelo PLS utilizando os espectros do soro teste com adição de glicose e com filtro SG, no espectrômetro #3.						
Parâmetro	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
y	0,801x + 29,1	0,817x + 34,4	0,252x + 39,2	0,563x + 0,532	0,718x + 10,5	0,148x + 291
RMSEcv (mg/dL)	31,5	18,2	13,2	0,641	9,01	34,4
R^2	0,777	0,779	0,135	0,605	0,808	0,051
r	0,881	0,882	0,367	0,777	0,898	0,225
Nº. de LVs	7	6	6	6	8	7

x = variável independente da expressão da regressão

As Figuras 33 e 34 mostram os gráficos de dispersão entre os valores de concentração reais e preditos para estas amostras sem e com filtro SG.

Espectrômetro #3 com glicose adicionada sem filtro SG

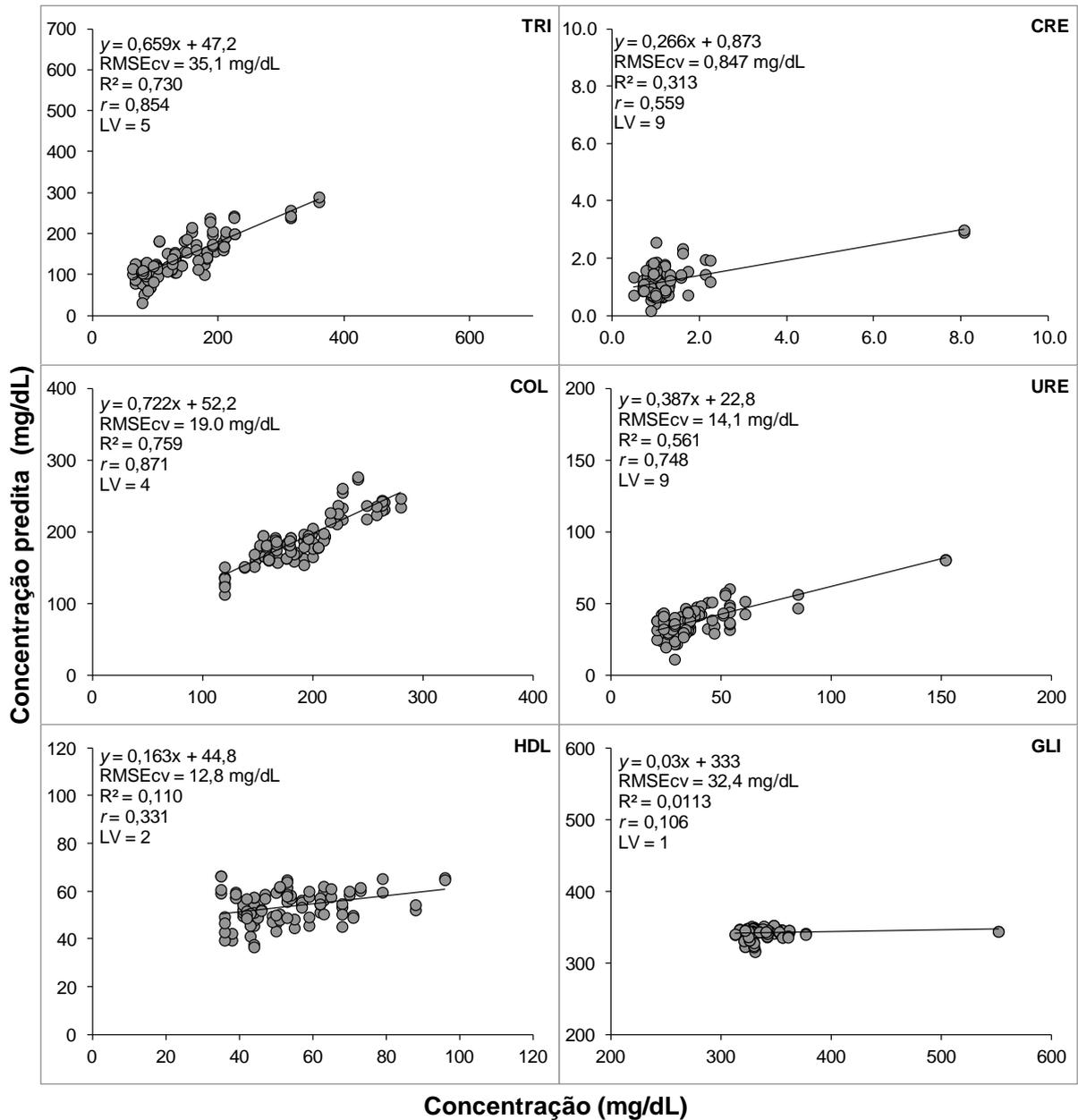


Figura 33 – Gráficos com as correlações das concentrações dos analitos das amostras de soro testados com adição de glicose, sem a aplicação do filtro SG, obtidas pelo método padrão *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS, utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LV são apresentados no gráfico.

Espectrômetro #3 com glicose adicionada com filtro SG

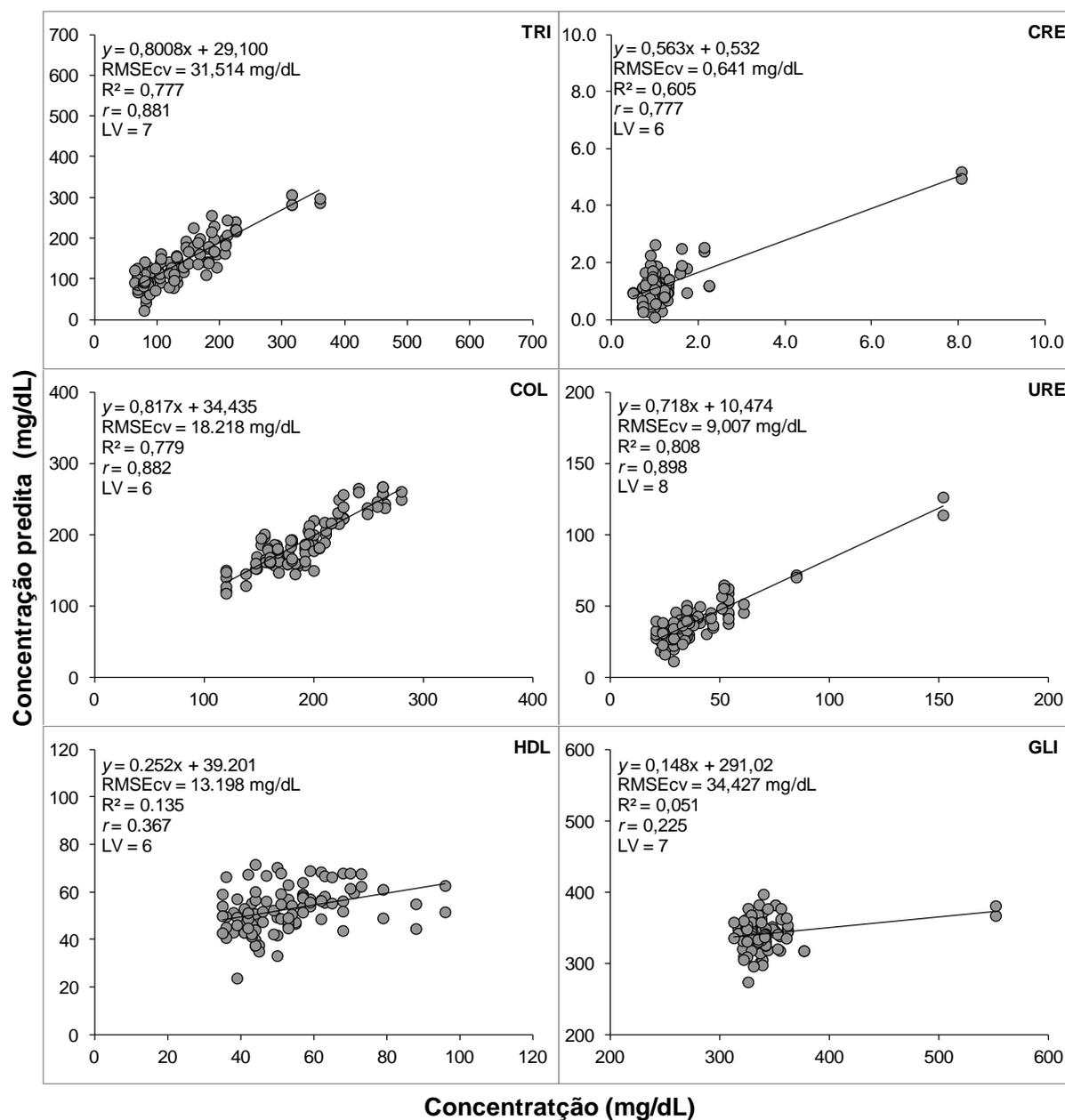


Figura 34 – Gráficos com as correlações das concentrações dos analitos das amostras de soro testados com adição de glicose, com a aplicação do filtro SG, obtidas pelo método padrão *versus* as concentrações previstas pelo modelo PLS, utilizando os espectros Raman obtidos no espectrômetro #3 (bancada). Os parâmetros y , RMSEcv, R^2 , r e LV são apresentados no gráfico.

4.7. RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS DE INTERESSE

O modelo de classificação dos espectros em Normal ou Alterado para os analitos TRI e COL resultou em classificação conforme a Tabela 13. Os melhores resultados foram observados no espectrômetro #3 utilizando o filtro SG, com acurácia maior que 90% para os dois analitos.

Tabela 13 – Tabela de confusão com os resultados do modelo de classificação aplicados aos espectros dos analitos TRI e COL obtidos em cada um dos espectrômetros.

Classificação pelo modelo PLS					
Espectrômetro #1		TRI (6 LV)		COL (4 LV)	
		Normal	Alterado	Normal	Alterado
TRI/COL	Normal	83	4	93	0
	Alterado	30	3	19	8
Acurácia		71,7%		84,2%	
Espectrômetro #2		TRI (8 LV)		COL (9 LV)	
		Normal	Alterado	Normal	Alterado
TRI/COL	Normal	159	5	146	10
	Alterado	24	12	21	23
Acurácia		85,5%		84,5%	
Espectrômetro #3*		TRI (4 LV)		COL (8 LV)	
		Normal	Alterado	Normal	Alterado
TRI/COL	Normal	61	3	70	2
	Alterado	4	34	8	22
Acurácia		93,1%		90,2%	
Espectrômetro #3**		TRI (7 LV)		COL (6 LV)	
		Normal	Alterado	Normal	Alterado
TRI/COL	Normal	57	7	72	0
	Alterado	12	26	12	18
Acurácia		81,4%		88,2%	

* usando o soro com filtro SG nos espectros

** usando o soro com adição de glicose e com filtro SG nos espectros

5. DISCUSSÃO

5.1. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE r E DE RMSE_{cv} OBTIDOS COM O MODELO PLS COM OS OBTIDOS NA LITERATURA

Na literatura referenciada foram encontrados valores de r e RMSE_{cv} diversos e dependentes da técnica e parâmetros utilizados pelos autores, como comprimento de onda, potência do laser, e tempo de aquisição dos espectros. Valores muito altos de r foram obtidos por Berger *et al.* (1997) com tempo de aquisição de 5 minutos em sangue total com glicose adicionada, obtendo $r = 0,99$ para GLI, com RMSE_{cv} = 65 mg/dL. Os mesmos autores obtiveram resultados melhores em termos de RMSE_{cv} para GLI, COL, TRI e URE, com RMSE_{cv} = 26,0, 12,0, 29,0 e 3,8 mg/dL, respectivamente, e valores de $r = 0,91, 0,91, 0,94$ e $0,86$, respectivamente, mudando a potencia de 150 para 250 mW e sem adicionar glicose (Berger *et al.*, 1999).

Rohleder *et al.* (2004) utilizaram soro *in natura* e ultrafiltrado para obter as concentrações de GLI, URE, COL, TRI HDL, obtendo resultados de $r = 0,90, 0,98, 0,95, 0,95$ e $0,70$, respectivamente, com erro médio quadrático de previsão (RMSE_p) de 17,1, 4,4, 11,5, 20,7 e 11,0 mg/dL, respectivamente, para o soro *in natura*, e $r = 0,99$ e $0,80$ e RMSE_p = 6,8 e 2,1 mg/dL para GLI e URE, respectivamente. O soro ultrafiltrado por centrifugação em Milipore para minimizar a fluorescência obteve $r = 0,99$ e $0,80$ e RMSE_p = 6,8 e 2,1 mg/dL, para GLI e URE, respectivamente. O mesmo autor (Rohleder *et al.*, 2005) fez a comparação entre os espectros obtidos com a técnica de absorção no infravermelho médio e com o Raman, obtendo valores de RMSE_{cv} = 15,6, 4,0, 15,1, 16,7, 10,9 mg/dL para GLI, URE, COL, TRI e HDL, respectivamente, usando o infravermelho. Os valores de RMSE_{cv} = 22,6, 3,9, 11,8, 19,3, 9,8 mg/dL, foram obtidos para GLI, URE, COL, TRI e HDL, respectivamente, usando o Raman, sendo o número de LVs diferentes em cada caso.

Em experimento *in vitro* e *in vivo*, com injeção de glicose em animais e coletando espectros em diferentes tempos, Shao *et al.* (2012) obtiveram as intensidades dos picos Raman da glicose (1125 cm^{-1}) e da hemoglobina (1549 cm^{-1}), que serviu como padrão interno. Os autores obtiveram correlação linear muito

forte ($r = 0,91$) entre as intensidades dos picos e os valores reais em todos os tempos.

Em estudo por nosso grupo de pesquisa, Borges *et al.* (2015) identificaram as diferenças espectrais relacionadas com os componentes lipídicos (COL, TRI, LDL e HDL) e GLI em soro humano, identificando os picos nos espectros da diferença entre pacientes com valor normal (ou de referência) *versus* alterado, baseados na concentração espectrofotométrica dos analitos, e classificando os espectros em “grupo normal” e “grupo alterado” por PCA. Os resultados percentuais da classificação correta foram: COL = 77%, TRI = 81%, LDL = 60%, HDL = 59% e GLI = 70%.

Almeida *et al.* (2016) correlacionaram as concentrações de URE e CRE em soro pela regressão PLS, com valores de $r = 0,97$ e $0,93$ e $RMSE_{cv} = 17,6$ e $1,94$ mg/dL, respectivamente. A classificação por PCA na discriminação entre indivíduos normais e dialisados forneceu uma precisão de 95%. Saatkamp *et al.* (2016) fizeram análise da concentração de URE e CRE na urina de pacientes sem e com alterações renais, via PLS, obtendo valores de $r = 0,90$ e $0,91$ e $RMSE_{cv}$ de $312,0$ e $25,2$ mg/dL, respectivamente.

Oleszko *et al.* (2017) avaliaram colesterol VLDL em amostras de plasma ultracentrifugadas e dessecadas provenientes de mulheres grávidas com hipertrigliceridemia, comparando os resultados obtidos por duas técnicas: microscopia Raman e FT-IR, com $r = 0,89$ e $RMSE_p = 0,27$ mmol/L para o Raman, e $r = 0,94$ e $RMSE_p = 0,20$ mmol/L para o FT-IR.

Seguindo o estudo de Borges *et al.* (2015), Silveira *et al.* (2017) propuseram um modelo de quantificação de analitos sanguíneos no soro humano utilizando PLS, obtendo os resultados para TRI, COL, HDL, LDL e GLI de $r = 0,98$, $0,96$, $0,75$, $0,86$ e $0,86$, respectivamente, e $RMSE_{cv} = 35,4$, $15,9$, $17,8$, $24,2$ e $26,4$ mg/dL, respectivamente.

Parachalil *et al.* (2019) empregaram a ultrafiltração do soro para separar frações de alto e baixo peso molecular por deposição em placa, e empregaram microscópio invertido acoplado ao espectrômetro Raman para gerar os espectros, obtendo valores, de $R^2 = 0,82$, $0,88$, $0,90$, $0,84$ e $0,92$ e $RMSE_{cv} = 115$, 126 , 90 , $1,8$ e $1,7$ mg/dL, para proteínas totais, gamaglobulinas, albumina, glicose e ureia, respectivamente, quantificadas via modelo PLS. Apesar dos bons resultados, o

método apresentado teve a desvantagem de ser demorado e pouco prático para a rotina laboratorial.

Correia *et al.* (2020) analisaram os espectros de soro humano com valores de PSA normais e alterados, e empregaram as técnicas multivariadas PCA-DA e PLS-DA para correlacionar essas diferenças com as concentrações obtidas pela técnica padrão (espectrofotométrica). A classificação por PCA-DA mostrou poder preditivo de 85,7%, com sensibilidade de 87,41% e especificidade de 76,47%. A classificação por PLS-DA mostrou uma alta sensibilidade (98,51%) e especificidade intermediária (62,75%). A correlação entre os valores reais e preditos por PLS foi de $r = 0,605$.

Giansante *et al.* (2022) avaliaram os analitos COL, TRI, HDL, URE, CRE e GLI com base na regressão PLS de espectros Raman do soro, obtendo os resultados de $r = 0,96, 0,96, 0,64, 0,89, 0,64$ e $0,62$, respectivamente, e $RMSE_{cv} = 10,5, 21,4, 13,0, 4,9, 0,21$ e $15,4$ mg/dL, respectivamente. Os resultados de r para COL e TRI foram muito fortes, o que segundo os autores sugere possibilidade de aplicação em rastreamento.

5.2. COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TRÊS EQUIPAMENTOS E O CEQ DO PNCQ

Os valores de r e $RMSE_{cv}$ dos três equipamentos utilizados no trabalho estão resumidos na Tabela 14. O espectrômetro #3 foi o que apresentou, em geral, uma correlação forte entre as concentrações reais e as previstas para os analitos lipídicos e a ureia, sem adição de glicose (TRI, COL e URE, $r = 0,795, 0,872$ e $0,723$, respectivamente), correlação moderada para o biomarcador renal CRE ($r = 0,670$). Correlações fracas foram obtidas para os analitos HDL e GLI ($r = 0,305$ e $0,270$, respectivamente). Já os valores de r com adição de glicose foram fortes e um pouco maiores (TRI, COL e URE, $r = 0,854, 0,871$ e $0,748$, respectivamente), correlação moderada mas menor para o biomarcador renal CRE ($r = 0,559$), e correlações fracas foram obtidas para os analitos HDL e GLI ($r = 0,331$ e $0,106$, respectivamente). Quando foi utilizado o filtro SG, os resultados foram melhores para todos os analitos: $r = 0,806, 0,887, 0,373, 0,859, 0,893$ e $0,504$, para TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI, respectivamente, e $RMSE_{cv} = 40,7, 19,2, 14,6, 0,70, 10,3$ e $31,6$ mg/dL, respectivamente, sem adição de glicose, e $r = 0,881, 0,882, 0,367,$

0,777, 0,898 e 0,225, respectivamente, e $RMSE_{cv} = 31,5, 18,2, 13,2, 0,64, 9,01$ e $34,4$ mg/dL, respectivamente, com adição de glicose.

Tabela 14– Comparação dos valores de r e $RMSE_{cv}$ dos analitos TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI para os três espectrômetros testados, com a utilização de soro sem e com adição de glicose e a aplicação ou não do filtro SG nos espectros.

Espectrômetro	Característica da amostra e parâmetro de processamento do espectro		Valor de r e de $RMSE_{cv}$ para cada analito em cada espectrômetro						
	Soro	Filtro SG	Parâmetro	TRI	COL	HDL	CRE	URE	GLI
#1	sem adição*	não	r	0,124	0,045	0,223	0,274	0,27	0,105
			$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	114	44,7	14,8	0,172	7,01	21,3
#2	sem adição*	não	r	0,818	0,807	0,357	0,321	0,365	0,370
			$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	42,9	22,4	12,1	0,170	8,02	40,2
#3	sem adição*	não	r	0,795	0,872	0,305	0,670	0,723	0,270
			$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	42,0	20,2	14,7	0,891	16,3	36,1
	sem adição*	sim	r	0,806	0,887	0,373	0,859	0,893	0,504
			$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	40,7	19,2	14,6	0,703	10,3	31,6
	adicionado**	não	r	0,854	0,871	0,331	0,559	0,748	0,106
			$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	35,1	19,0	12,8	0,847	14,1	32,5
adicionado**	sim	r	0,881	0,882	0,367	0,777	0,898	0,225	
		$RMSE_{cv}$ (mg/dL)	31,5	18,2	13,2	0,641	9,01	34,4	

* soro sem adição de glicose

** soro com adição de 260 mg/dL de glicose

O espectrômetro #2 apresentou correlação forte para os analitos lipídicos (TRI e COL, $r = 0,818$ e $0,807$, respectivamente), e correlação fraca para os demais analitos (HDL, CRE, URE e GLI, $r = 0,357, 0,321, 0,365$ e $0,370$, respectivamente). Já o espectrômetro #1 mostrou correlação fraca em todos os analitos testados (TRI, COL, HDL, CRE, URE e GLI, $r = 0,124, 0,045, 0,223, 0,274, 0,270$ e $0,105$, respectivamente), sugerindo não atender aos requisitos determinados pelo PRO-EX.

Na análise dos valores dos parâmetros $RMSE_{cv}$, R^2 e r , obtidos no espectrômetro #3, após a adição de glicose e utilizando os espectros sem e com filtro SG, verificou-se que o uso deste filtro nos espectros Raman melhora sensivelmente a correlação dos valores preditivos dos analitos testados.

Pode-se observar que os valores de r para as frações lipídicas TRI e COL para o equipamento #2 (portátil) e para o #3 (bancada), com adição de glicose,

forneceram valores superiores a 0,81, que são comparáveis à literatura citada, e podem atender aos critérios de excelência do PRO-EX, já que mostraram correlação forte entre os valores reais e os preditos. Os valores de RMSEcv, que evidenciam o erro entre os valores reais e os preditos pelo modelo, foram baixos para estes dois analitos lipídicos.

A literatura científica pesquisada mostra uma disparidade de resultados para os valores de r e RMSE com o analito GLI, o qual evidenciou correlação muito forte em alguns trabalhos (Berger *et al.*, 1997 – $r = 0,99$ e RMSEcv = 65,0 mg/dL; Berger *et al.*, 1999 – $r = 0,91$ e RMSEcv = 26,0 mg/dL; Rohleder *et al.*, 2004 – $r = 0,90$ e RMSEcv = 17,1 mg/dL sem filtração e $r = 0,99$ e RMSEcv = 6,8 mg/dL após filtração; Shao *et al.*, 2012 – $r = 0,95$; Oleszko *et al.*, 2017 – $r = 0,99$ e RMSEcv = 65,0 mg/dL; Parachalil *et al.*, 2019 – $r = 0,91$ e RMSEcv = 1,8 mg/dL), e correlação forte ou moderada em outros, inclusive com a utilização do mesmo equipamento (Silveira *et al.*, 2017 – $r = 0,86$ e RMSEcv = 26,4 mg/dL; Giansante *et al.*, 2022 – $r = 0,62$ e RMSEcv = 15,4 mg/dL).

O espectrômetro #1 mostrou resultados pouco confiáveis para a predição de concentrações de analitos sanguíneos, já que os valores de r mostrados na Tabela 14 indicam uma correlação fraca ($r < 0,3$) para todos os analitos testados, inviabilizando sua utilização para diagnóstico laboratorial ou mesmo triagem.

Os valores de r para o espectrômetro #2 foram fortes para TRI e COL ($r = 0,818$ e $0,807$, respectivamente) conforme apresentados na Tabela 14, trazendo expectativa para seu possível uso em triagem laboratorial, já que os valores fortes de correlação podem resultar em erros de previsão menores. Os outros analitos testados tiveram correlação moderada ($r < 0,4$), e não tem qualidade diagnóstica, mesmo para triagem.

Para o espectrômetro #3, os valores de r foram, em geral, melhores que os do espectrômetro #2, conforme visto na Tabela 14. Além disso, os valores obtidos com o uso do filtro SG foram superiores aos obtidos sem filtro, e com glicose adicionada foram ainda melhores sem e com filtro SG. Porém, assim como ocorreu com os resultados do espectrômetro #2, somente os analitos TRI e COL alcançaram comparativamente o critério “Excelente” do PNCQ ($r = 0,806$ e $0,887$, para TRI e COL, respectivamente). Apesar de CRE e URE terem correlação forte ($r = 0,859$ e $0,893$, respectivamente) com filtro SG, os valores de RMSEcv foram altos; a alta correlação pode ser explicada pela existência de uma amostra com valores altos

destes dois analitos, o que leva a curva a se ajustar a poucos pontos, que são lineares, porém com valores de concentração mais altos.

A suposição de que adição de glicose no soro pudesse fornecer resultados melhores na predição da concentração de GLI, pelo aumento do espalhamento por este analito, não se confirmou, havendo piora do resultado de r para a GLI nos casos sem e com filtro SG. Os valores obtidos foram $r = 0,225$ e $0,106$, respectivamente, com adição de glicose, e de $r = 0,504$ e $0,270$, respectivamente, sem adição de glicose. Surpreendentemente, houve discreta melhora nos valores de r para os analitos TRI e COL ($r = 0,854$ e $0,871$ para a medição sem o filtro SG, e $r = 0,881$ e $0,882$ para a medição com filtro, respectivamente). Os outros analitos não tiveram mudanças significativas nos valores de r com a adição de glicose.

A literatura apresenta resultados de quantificação de analitos em soro empregando diferentes equipamentos e metodologias. Em geral, os experimentos empregaram espectrômetros no infravermelho próximo (785 e 830 nm) e modelos espectrais baseados em estatística multivariada como a regressão PLS ou regressão baseada na PCA aplicados nos espectros Raman, em geral utilizando os resultados de medição obtidos com o método espectrofotométrico (padrão ouro) como fonte da concentração real. No geral, esses estudos buscaram obter os valores de r e de RMSEcv ou RMSEp para cada analito, de forma a validar a técnica Raman como uma ferramenta para o diagnóstico laboratorial.

5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ciência e a técnica evoluem rapidamente em função de necessidades concretas, especialmente quando envolvem redução de tempo e custos em benefício da população. Na rotina laboratorial atual, o espectrofotômetro que utiliza reagentes químicos de colorimetria para quantificar cada analito, o faz de forma individual, demandando um tempo de reação variável para cada teste, em torno de 10 minutos cada. A técnica Raman é capaz de fornecer informações com uma única medição, e permite obter resultados de vários exames laboratoriais sem uso de reagentes e em um tempo menor (próximo de 1 minuto) com o modelamento por regressão PLS, tornando-se uma técnica necessária e desejável para auxiliar o diagnóstico clínico de forma rápida e eficiente.

A qualidade do espectro Raman depende das características do equipamento, que podem impactar o nível de ruído observado nos espectros. A absorção e consequente emissão da fluorescência também é um fator que impacta a RSR, gerando ruído de fóton no espectro Raman, podendo ser confundida com um sinal. Na espectroscopia Raman, a luz espalhada é habitualmente muito fraca e pode limitar as aplicações. É importante conhecer as eventuais fontes de ruído e outros sinais que não pertencem à estrutura da amostra analisada e/ou não correspondem ao espalhamento Raman, pois de sua ausência depende a precisão dos resultados quando se quer determinar a concentração de uma substância.

As correlações na predição da concentração de analitos devem ser fortes ou muito fortes, porém seguidas por erros de previsão baixos, a fim de atender aos critérios de excelência preconizados pelo PRO-EX. A busca por erros menores que 10%, tanto por melhorias da coleta de dados quanto do processamento, pode levar à adoção da técnica Raman na triagem laboratorial. No trabalho desenvolvido e aqui descrito, observou-se, inclusive, uma diminuição do valor de r obtido no espectrômetro #3 para a GLI, com o passar do tempo (valores de $r = 0,86, 0,62$ e $0,27$ obtidos por Silveira *et al.* em 2017, por Giansante *et al.* em 2022, e neste trabalho, respectivamente), indicando que o fator tempo de uso do equipamento pode influenciar sua eficiência, e as condições pré-analíticas e analíticas podem modificar os resultados, sugerido que mais estudos serão necessários para verificar a influência dos parâmetros de aquisição dos espectros e as diferenças nos tipos de equipamentos e idades dos mesmos.

Como não foi possível realizar um teste comparativo utilizando o mesmo comprimento de onda de excitação para os três equipamentos (os espectrômetros #1 e #2 empregam 785 nm e o espectrômetro #3 emprega 830 nm), sugere-se um estudo futuro utilizando os mesmos comprimentos de onda de excitação em diferentes equipamentos e outros comprimentos de onda em equipamentos portáteis ou mesmo “*handhelds*” para observar a viabilidade da resposta destes e de outros analitos para triagem, já que alguns trabalhos citam um comprimento de onda de 532 nm para glicose (Firdous *et al.*, 2012), e dado que um dos principais objetivos do trabalho aqui apresentado é o de obter condições experimentais de se realizar triagem de rotina de exames de frações lipídicas e de glicose em rotina laboratorial em um espectrômetro Raman portátil, proporcionando rapidez e eficiência com baixo custo.

Neste estudo, as limitações foram a falta de variabilidade do comprimento de onda de excitação do laser, que dificultou uma comparação direta da eficiência analítica

de cada equipamento, a quantidade relativamente baixa de amostras de soro para um modelamento mais consistente, a falta de variação do tempo de aquisição dos espectros e, principalmente, a indisponibilidade para trabalho mais extenso (coleta de mais espectros) com o espectrômetro #2, que foi cedido por empréstimo para testes por apenas duas semanas.

A avaliação de biomarcadores de diversas naturezas (principalmente inflamatórios), hormônios, analitos indicadores de outras patologias (neoplasias, por exemplo), dentre outros, podem aumentar o alcance da técnica, a fim de abranger boa parte da rotina laboratorial.

É de especial importância a especificação de um porta-amostras adequado para a coleta dos espectros Raman visando triagem laboratorial, o qual deve ser adaptado em um espectrômetro automatizado ou semiautomatizado que possa analisar todas as amostras de soro de forma contínua e em material de baixo custo e descartável, como o vidro, o poliestireno ou outro polímero plástico, o qual deve ser testado em diferentes condições para o trabalho.

A espectroscopia Raman é um método rápido, sem utilização de reagentes e sem necessidade de preparação das amostras, que associado a um modelo de regressão multivariada como a PLS, pode fornecer a concentração de determinados analitos relacionados à síndrome metabólica e a outras patologias, utilizando uma única medição para a obtenção da concentração de vários analitos. Desta forma, pode-se vislumbrar seu uso em triagens dos analitos lipídicos, como colesterol e triglicérides, em grandes centros de saúde públicos, como o SUS, ou mesmo privados.

A espectroscopia Raman possui algumas limitações de uso, como a presença de absorção e fluorescência em algumas amostras, que diminui a quantidade de fótons espalhados (absorção) e introduz sinal (fluorescência) que gera ruído. O espalhamento (Rayleigh e Raman) é mais eficiente em amostras transparentes, e piora em amostras opacas, porém é dependente do comprimento de onda de excitação (infravermelho próximo absorve menos que o visível porém espalha menos), depende também da polarizabilidade molecular e da mudança da polarizabilidade durante a vibração molecular, o que pode gerar um espalhamento Raman muitas vezes fraco.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade da espectrometria Raman portátil para prever a concentração de analitos no soro de sangue humano, comparando o desempenho analítico de três espectrômetros Raman comerciais buscando a validação do método Raman em diferentes condições experimentais. Como resultado, destacou-se que alguns dos parâmetros testados, principalmente os analitos lipídicos, mostraram resultados alentadores. Parâmetros de qualidade muito bons (correlação forte – $r > 0,80$) foram obtidos para triglicérides e colesterol total, nos espectrômetros #2 e #3, com potencial para uso futuro na triagem laboratorial. Outros analitos testados com interesse em análises clínicas, como a glicose, que constitui um dos mais importantes testes para o diagnóstico de doenças metabólicas como diabetes, a ureia e a creatinina, patognomônicos de doenças renais, e o HDL, responsável pela eliminação das gorduras das artérias, apresentaram uma correlação moderada ($r < 0,50$) ou fraca ($r < 0,30$), dado que nas concentrações fisiológicas o sinal espalhado proveniente destas biomoléculas é muito fraco.

As correlações obtidas para os analitos TRI e COL para o espectrômetro de bancada #3 e um dos espectrômetros portáteis, #2 foram fortes ($r > 0,81$), e as taxas de acertos na classificação entre “Normal” e “Alterado” destes dois analitos foram maiores que 90%, o que sugere possibilidade de utilização em análises clínicas. A adição de glicose no soro melhorou a correlação e o erro médio quadrático dos analitos TRI e COL, com valores de $r = 0,854$ e $0,871$, e $RMSE_{cv} = 35,1$ e $19,0$ mg/dL, respectivamente, sem uso do filtro SG, e $r = 0,881$ e $0,882$, e $RMSE_{cv} = 31,5$ e $18,2$ mg/dL, respectivamente, com uso do filtro SG, porém não melhorou os acertos na classificação.

Os resultados demonstraram que o espectrômetro de bancada possui maior eficiência quantitativa que os portáteis, tendo a desvantagem de ser grande e pesado para uso na triagem em campo. Equipamentos portáteis apresentam dimensões reduzidas podendo ser movimentados mais facilmente e, o mais moderno deles (espectrômetro #2), que possui características técnicas mais apuradas que o espectrômetro #1 (mais antigo), apresentou resultados comparáveis ao de bancada, especialmente para os analitos TRI e COL, abrindo a possibilidade

de melhorar “*hardware*” e “*software*” objetivando aperfeiçoar a RSR e obter-se espectros de maior qualidade.

REFERÊNCIAS

ADJ Diabetes Brasil. **Diabetes em pauta. Federação Internacional de Diabetes divulga novos dados da doença no Brasil.** São Paulo: ADJ Diabetes Brasil, 2021. Disponível em: <https://adj.org.br/2021/11/12/idf-divulga-dados-sobre-o-diabetes-no-brasil/>. Acesso em: 10 de julho de 2022.

Alcalde, P.R.; Mastroianni Kirsztajn, G. Gastos do Sistema Único de Saúde brasileiro com doença renal crônica. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, n. 2, p. 122-129, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-3918>

Almeida, M.L.; Saatkamp, C.J.; Fernandes, A.B.; Pinheiro, A.L.B.; Silveira, L. Estimating the concentration of urea and creatinine in the human serum of normal and dialysis patients through Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 31, p. 1415-1423, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2003-y>

Anton Paar. **E411A026EN-A – Finding the optimal focus position using Cora 5001 Fiber.** Graz: Anton Paar GmbH, 2018. Disponível em: www.anton-paar.com. Acesso em: 10 de março de 2022.

Atkins, C.G.; Buckley, K.; Blades, M.W.; Turner, R.F.B. Raman spectroscopy of blood and blood components. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 5, p. 767-793, 2017. <https://doi.org/10.1177/0003702816686593>. Acesso em: 12 de março de 2022.

Banchs, J.E.; Scher, D.L. Emerging role of digital technology and remote monitoring in the care of cardiac patients. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 4, p. 877-896, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.02.013>.

Baranska, M. **Optical spectroscopy and computational methods in biology and medicine.** Dordrecht: Springer, 2014. 540 p.

Barman, I.; Narahara, C.D.; Kang, J.W.; Horowitz, G.L.; Dasari, R.R.; Feld, M.S. Raman spectroscopy-based sensitive and specific detection of glycosylated hemoglobin. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2474-2482. 2012. <https://doi.org/10.1021/ac203266a>.

Barton, B.; Thomson, J.; Lozano Diz, E.; Portela, R. Chemometrics for Raman spectroscopy harmonization. **Applied Spectroscopy**, v. 76, n. 9, p. 1021-1041, 2022. <https://doi.org/10.1177/00037028221094070>

Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M.B. **Chemometrics: A practical guide.** New York: Wiley Interscience, 1998. 348 p.

Berger, A.J.; Itzkan, I.; Feld, M.S. Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 53, n. 2, p. 287-292, 1997. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(96\)01779-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(96)01779-9)

Berger, A.J.; Koo, T.W.; Itzkan, I.; Horowitz, G.; Feld, M.S. Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. **Applied Optics**, v. 38, n. 13, p. 2916-2926, 1999. <https://doi.org/10.1364/ao.38.002916>

Bergholt, M.S.; Hassing, S. Quantification of C-reactive protein in human blood plasma using near-infrared Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 134, n. 10, p. 2123-2127, 2009. <https://doi.org/doi:10.1039/b903089a>

Biancolillo, A.; Marini, F. Chemometric methods for spectroscopy-based pharmaceutical analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 576, 2018. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00576>

Bispo, J.A.; Sousa Vieira, E.E.; Silveira, L.; Fernandes, A.B. Correlating the amount of urea, creatinine and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 8, p. 87004, 2013. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.8.087004>

Bonifacio, A.; Dalla Marta, S.; Spizzo, R.; Cervo, S.; Steffan, A.; Colombatti, A.; Sergo, V. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: A systematic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 9-10, p. 2355-2365, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7622-1>

Borges, R.C.F.; Navarro, R.S.; Giana, H.E.; Tavares, F.G.; Fernandes, A.B.; Silveira, L. Detecting alterations of glucose and lipid components in human serum by near-infrared Raman spectroscopy. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 160-168, 2015. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0593>

Bratchenko, I.A.; Bratchenko, L.A.; Moryatov, A.A.; Khristoforova, Y.A.; Artemyev, D.N.; Myakinin, O.O.; Orlov, A.E.; Kozlov, S.V.; Zakharov, V.P. *In vivo* diagnosis of skin cancer with a portable Raman spectroscopic device. **Experimental Dermatology**, v. 30, n. 5, p. 652-663, 2021. <https://doi.org/10.1111/exd.14301>

Brereton, R.G. **Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. p. 489. <https://doi.org/10.1002/0470863242>

Calvo, N.L.; Maggio, R.M.; Kaufman, T.S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 538-564, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.017>

Chaves, G.S.S.; Ghisi, G.L.M.; Grace, S.L.; Oh, P.; Ribeiro, A.L.; Britto, R.R. Effects of comprehensive cardiac rehabilitation on functional capacity and cardiovascular risk factors in Brazilians assisted by public health care: protocol for a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 20, n. 6, p. 592-600, 2016. <https://doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0192>

Chunxiu, H.U.; Heijden, R.; Wang, M.; Greef, J.; Hankemeier, T.; Xu, G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2836-2846, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.038>

Claro, P.R. Espectroscopia vibracional, **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 2, p. 40, 2018. <https://doi.org/10.24927/rce2018.040>

Colomban, P.; Gouadec, G. Raman scattering theory and elements of Raman instrumentation. *In*: Amer M.S. **Raman spectroscopy for soft matter applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. Cap. 2, p. 11-29, 2009.
<https://doi.org/10.1002/9780470475997.ch2>

Correia, N.; Batista, L.; Nascimento, R.; Cangussú, M.; Crugeira, P.; Soares, L.; Silveira Jr, L.; Pinheiro, A. Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: A multivariate study on patients with normal and altered PSA values. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111801, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111801>

Dingari, N.C.; Horowitz, G.L.; Kang, J.W.; Dasari, R.R.; Barman, I. Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32406, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>

Dou, Y.; Yamaguchi, Y.; Yamamoto, H.; Uenoyama, H.; Ozaki, Y. Biological applications of Anti-Stokes Raman spectroscopy: quantitative analysis of glucose in plasma and serum by a highly sensitive multichannel Raman spectrometer. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n. 10, p. 1301-1306, 1996.
<https://doi.org/10.1366/0003702963905042>

Drees, J.C.; Wu, A.H.B. Analytical techniques. *In*: Bishop, M.L.; Fody, E.P.; Schoeff, L.E. (org.) **Clinical chemistry, techniques, principles, correlations**. 6. Ed. Philadelphia: Harper & Row Publishers, 2010. Cap. 5, p. 130-136. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=9ef5c4d95365e2b56964366199df7cc002fca60a>. Acesso em: 12 de março de 2022.

Faria, D.L.A. **Entenda o que é espectroscopia Raman**. São Paulo: Instituto de Química da USP, 2011. Disponível em: https://www.crq4.org.br/sms/files/file/Espectroscopia_Raman_4.pdf. Acesso em: 15 de julho de 2022.

Ferreira, M.M.C. **Quimiometria – Conceitos, métodos e aplicações**. 1. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2015. p. 493. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>

Ferreira, M.M.C. Quimiometria III – Revisitando a análise exploratória dos dados multivariados. **Química Nova**, v. 45, n. 10, p. 1251-1264, 2022.
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170910>

Fipps, D.R.; Damato, J.J.; Brandt, B.; Burke, D.S. Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. **Journal of Virological Methods**, v. 20, n. 2, p. 127-32, 1988. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90146-2)

Firdous, S.; Nawazb, M.; Ahmedc, M.; Anwara, S.; Rehmana, A.; Rashidb, R.; Mahmoodb, A. Measurement of diabetic sugar concentration in human blood using Raman spectroscopy. **Laser Physics**, v. 22, n. 6, p. 1090-1094, 2012. <https://doi.org/10.1134/S1054660X12060023>

Gaba, F.; Tipping, W.J.; Salji, M.; Faulds, K.; Graham, D.; Leung, H.Y. Raman spectroscopy in prostate cancer: techniques, applications and advancements. **Cancers (Basel)**, v. 14, n. 6, p. 1535, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14061535>

Gemperline, P. **Practical guide to chemometrics**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 552 p. <https://doi.org/10.1201/9781420018301>

Giansante, S; Giana, H.E.; Fernandes, A.B.; Silveira, L. Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 1, p. 287-298, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03247-8>

Gislefoss, R.E.; Grimsrud, T.K.; Mørkrid, L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 5, p. 596-603, 2009. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.121>

Gonzalez-Viveros, N.; Castro-Ramos, J.; Gomez-Gil, P.; Cerecedo-Nunez, H.; Gutierrez-Delgado, F.; Torres-Rasgado, E.; Perez-Fuentes, R.; Flores-Guerrero, J. Quantification of glycated hemoglobin and glucose *in vivo* using Raman spectroscopy and artificial neural networks. **Lasers in Medical Science**, v. 37, p. 3537-3549, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03633-w>

Guedes, I.; Moreira, J.E. **O efeito Raman. Um tipo de espalhamento da luz que traz informações sobre os modos que as moléculas têm de vibrar**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2022. Disponível em: <https://seara.ufc.br/pt/producoes/nossas-producoes-e-colaboracoes/secoes-especiais-de-ciencia-e-tecnologia/secoes-especiais-fisica/o-efeito-raman/>. Acesso em: 21 de março de 2023.

Guzel, O.; Guner, E.I. ISO 15189 Accreditation: requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 4-5, p. 274-278, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.09.011>

Hanlon, E.B.; Manaharan, R.; Koo, T.W.; Shafer, K.E; Motz, J.T.; Fitzmaurice, M.; Kramer, J.R.; Itzkan, I.; Dasani, R.R.; Feld, M.S. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, 2000. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/2/201>

Hsu, P.H.; Chiang, H.K. Surface-enhanced Raman spectroscopy for quantitative measurement of lactic acid at physiological concentration in human serum. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 12, p. 1610-1614, 2010. <https://doi.org/10.1002/jrs.2609>

IS Instruments. **Spectral response correction: The effect of etaloning**. Chicago: AzoNetwork Site, 2017. Disponível em: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=14009>. Acesso em: 2 de março de 2022.

Khristoforova, Y.A.; Bratchenko, L.A.; Skuratova, M.A.; Lebedeva, E.A.; Lebedev, P.A.; Bratchenko, I.A. Raman spectroscopy in chronic heart failure diagnosis based on human skin analysis. **Journal of Biophotonics**, v. 16, n. 7, p. e202300016, 2023. <https://doi.org/10.1002/jbio.202300016>

Kuchmak, M.; Tailor, L.; Olanski, A.S. Suitability of frozen and lyophilized reference sera for cholesterol and triglyceride determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 120, n. 2, p. 261-271, 1982. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90163-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90163-2)

Lange, L.A.; Galgowski, C.; Roncalio, A.C.; Sehnen, F.; Borgmann, G.; Mendez de Córdova, C.M. Evaluation of the quality and the stability of human samples for analysis and storage in biorepository. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 1, p. 50-56, 2018. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800637>

Larsson, K.; Hellgren, L. A Study of the Combined Raman and fluorescence scattering from human blood plasma. **Experientia**, v. 30, n. 5, p. 481-483, 1974. <https://doi.org/10.1007/BF01926305>

Lewis, F.J.; Torgerson, P. A tutorial in estimating the prevalence of disease in humans and animals in the absence of a gold standard diagnostic. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 9, p. 1-8, 2012. <https://doi.org/10.1186/1742-7622-9-9>

Li, Z.; Deen, M.J.; Kumar, S.; Selvaganapathy, P.R. Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring – Instrumentation and potential. **Sensors**, v. 14, n. 9, p. 17275-17303, 2014. <https://doi.org/10.3390/s140917275>

Lima, L.S. Lei de Lambert-Beer, **Revista de Ciência Elementar**, v. 1, n. 1, p. 47, 2013. <http://doi.org/10.24927/rce2013.047>

Lin, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Li, B.; Huang, P.; Wang, Z. Estimation of the age of human bloodstains under the simulated indoor and outdoor crime scene conditions by ATR-FTIR spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 13254, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13725-1>

Lykina, A.A.; Artemeyev, D.N.; Bratchenko, I.A. Analysis of albumin Raman scattering registration efficiency from different volume and shape cuvette. **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.18287/JBPE17.03.020309>

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diretoria Colegiada. **Resolução RDC No. 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional De Vigilância Sanitária, 2017. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucaordc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 21 de fevereiro de 2022.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas & Respostas. RDC No. 786/2023 – Requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de laboratórios clínicos, de laboratórios de anatomia patológica e de outros serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC).** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/perguntas-e-respostas-rdc-786-23.pdf>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2022.

Ministério da Saúde, Biblioteca Virtual em Saúde. **14/3 – Dia Mundial do Rim 2019: Saúde dos Rins Para Todos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/14-3-dia-mundial-do-rim-2019-saude-dos-rins-para-todos/>. Acesso em: 25 de abril de 2022.

Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. **Resolução No. 466, de 12 de dezembro de 2012.** Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/conselho-nacional-de-saude/pt-br/aceso-a-informacao/legislacao/resolucoes/2012/resolucao-no-466.pdf>. Acesso em: 18 fevereiro de 2022.

Momesso, D.P.; Costa, R.C.F.; Costa, J.L.F.; Saddy, F.; Mesquita, A.; Calomeni, M.; Silva, C.S.; Farret, J.; Vasques, M.L.; Santos, A.G.; Cabral, A.P.V.; Ribeiro, D.; Reis, L.; Muino, M.F.M.; Vitorino, R.S.; Monteiro, C.A.; Tinoco, E.; Volschan, A. Impact of an inpatient multidisciplinary glucose control management program. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 514-522, 2018. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000071>

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. **Lancet**, v. 404, n. 10467, p. 2077-2093, 2024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)02317-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)02317-1) Erratum in: **Lancet**, v.405, n. 10485, p. 1146, 2025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00620-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00620-8)

Nilson, E.A.F.; Andrade, R.C.S.; Brito, D.A.; Oliveira, M.L. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e32, 2020. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.32>

Nunes, C.A.; Freitas, M.P.; Pinheiro, A.C.M.; Bastos, S.C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical**

Society, v. 23, p. 2003-2010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>

Oleszko, A.; Hartwich, J.; Wójtowicz, A.; Gąsior-Głogowska, M.; Huras, H.; Komorowska, M. Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 183, p. 239-246, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.020>

Oliveira, G.M.M.; Brant, L.C.C.; Polanczyk, C.A.; Malta, D.C.; Biolo, A.; Nascimento, B.R.; Souza, M.F.M.; Lorenzo, A.R.D.; Fagundes Júnior, A.A.P.; Schaan, B.D.; Silva, C.G.S.; Castilho, F.M.; Cesena, F.H.Y.; Soares, G.P.; Xavier Junior, G.F.; Barreto Filho, J.A.S.; Passaglia, L.G.; Pinto Filho, M.M.; Machline-Carrion, M.J.; Bittencourt, M.S.; Pontes Neto, O.M.; Villela, P.B.; Teixeira, R.A.; Stein, R.; Sampaio, R.O.; Gaziano, T.A.; Perel, P.; Roth, G.A.; Ribeiro, A.L.P. Estatística cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, n. 1, p. 11-373, 2022. <https://doi.org/10.36660/abc.20211012>

Oliveira, G.M.M.; Brant, L.C.C.; Polanczyk, C.A.; Malta, D.C.; Biolo, A.; Nascimento, B.R.; Souza, M.F.M.; Lorenzo, A.R.D.; Fagundes Júnior, A.A.P.; Schaan, B.D.; Silva, C.G.S.; Castilho, F.M.; Cesena, F.H.Y.; Soares, G.P.; Xavier Junior, G. F.; Barreto Filho, J.A.S.; Passaglia, L.G.; Pinto Filho, M.M.; Machline-Carrion, M.J.; Bittencourt, M.S.; Pontes Neto, O.M.; Villela, P.B.; Teixeira, R.A.; Stein, R.; Sampaio, R.O.; Gaziano, T.A.; Perel, P.; Roth, G.A.; Ribeiro, A.L.P. Estatística cardiovascular – Brasil 2023. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 121, n. 2, p. e20240079, 2024. <https://doi.org/10.36660/abc.20240079>

Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS. **Casos de diabetes aumentaram quatro vezes nas últimas décadas em todo o mundo; ação urgente é necessária**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/14-11-2024-casos-diabetes-aumentaram-quatro-vezes-nas-ultimas-decadas-em-todo-mundo-acao>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2023.

Parachalil, D.; Bruno, C.; Bonnier, F.; Blasco, H.; Chourpa, I.; McIntyrea, J.; Byrne, H. Raman spectroscopic screening of high and low molecular weight fractions of human serum. **Analyst**, v. 144, p. 4295-4311, 2019. <https://doi.org/10.1039/c9an00599d>

Parker, F.S. Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry. **Journal of Molecular Structure**, v. 128, n. 4, p. 366, 1985. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(85\)85012-2](https://doi.org/10.1016/0022-2860(85)85012-2)

Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violência: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2015. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/PNS%20Vol%202.pdf>. Acesso em: 25 de março de 2022.

Pessoa, V.R.A.; Rios, D.R.A. Acreditação e certificação nos laboratórios clínicos no Brasil: um panorama atual. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 4, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.29327/226760.4.3-2>

Poon, K.W.C.; Lyng, F.M.; Knief, P.; Howe, O.; Meade, A.D.; Curtin, J.F.; Byrne, H.J.; Vaughan, J. Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human bplasma using Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 137, n. 8, p. 1807-1814, 2012. <https://doi.org/10.1039/C2AN35042D>

Premasiri, W.R.; Clarke, R.H.; Womble, M.E. Urine analysis by laser Raman spectroscopy. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 330-334, 2001. <https://doi.org/10.1002/lsm.1058>

Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ 1993. **Controle Externo da Qualidade ou Ensaio de Proficiência – PRO-EX**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 1993. Disponível em: <https://pncq.org.br/o-programa/programas/pro-ex/>. Acesso em: 20 de março de 2022.

Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ 2023. **Manual do laboratório participante. Ensaio de proficiência**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2023. Disponível em: <https://pncq.org.br/wp-content/uploads/2023/06/Manual-do-Laboratorio-Participante-2023-FINAL-WEB.pdf>. Acesso em: 20 de março de 2022.

Qi, D.; Berger, A.J. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy. **Applied Optics**, v. 46, n. 10, p. 1726-1734, 2007. <https://doi.org/10.1364/AO.46.001726>

Qu, J.Y.; Wilson, B.C.; Suria, D. Concentration measurements of multiple analytes in human sera by near-infrared laser Raman spectroscopy. **Applied Optics**, v. 38, n. 25, p. 5491-5498, 1999. <https://doi.org/10.1364/AO.38.005491>
Ramasamy, I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 454, p. 143-185, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.033>

Rein, A.J.; Saperstein, D.; Pines, S.H.; Radlick, P.C. Blood Plasma Investigations by Resonance Raman Spectroscopy: Detection of Carotenoid Pigments. **Experientia**, v. 32, n. 10, p. 1352-1354, 1976. <https://doi.org/10.1007/BF01953136>

Rinnan, A.; Van Den Berg, F.; Engelsen, S.B. Review of the most common preprocessing techniques for near-infrared spectra, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>

Rohleder, D.; Kieferb, W.; Petrich, W. Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 129, n. 10, p. 906-911, 2004. <https://doi.org/10.1039/b408927h>

Rohleder, D.; Kocherscheidt, G.; Gerber, K.; Kiefer, W.; Petrich, W. Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum. **Journal**

of **Biomedical Optics**, v. 10, n. 3, p. 031108, 2005.
<https://doi.org/10.1117/1.1911847>

Saatkamp, C.J.; Almeida, L.L.; Bispo, J.A.; Pinheiro, A.L.; Fernandes, A.B.; Silveira, L. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 3, p. 037001, 2016. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.3.037001>

Salle, B.; Meijer, P.; Thomas, A.; Simundic, A.M. Special issue on External Quality Assessment in Laboratory Medicine – Current challenges and future trends. **Biochemia Medica**, v. 27, n. 1, p. 19-22, 2017.
<https://doi.org/10.11613/BM.2017.003>

Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC. **Estatísticas Cardiovasculares 2023 apontam que mais de R\$ 1 bilhão são gastos anualmente com procedimentos cardiovasculares no Brasil pelo SUS**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2023. Disponível em: <https://www.portal.cardiol.br/post/estatisticas-cardiovasculares-2023-apontam-que-mais-de-rs-1-bilhao-sao-gastos-anualmente-com-procedimentos-cardiovasculares-no-brasil-pelo-sus>. Acesso em 12 de julho de 2023.

Shao, J.; Lin, M.; Li, Y.; Li, X.; Liu, J.; Liang, J.; Yao, H. *In vivo* blood glucose quantification using Raman spectroscopy. **PLOS One**, v. 7, n. 10, p. e48127, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048127>

Sim, J.; Wright, C.C. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. **Physical Therapy**, v. 85, n. 3, p. 257–268. 2005.
<https://doi.org/10.1093/ptj/85.3.257>

Silveira, L.; Sathaiah, S.; Zângaro, R.A.; Pacheco, M.T.T.; Chavantes, M.C.; Pasqualucci, C.A.G. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 290-297.2002.
<https://doi.org/10.1002/lsm.10053>

Silveira, L.; Borges, R.C.F.; Navarro, R.S.; Giana, H.E.; Zângaro, R.A.; Pacheco, M.T.T.; Fernandes, A.B. Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers in Medical Science**, v. 32, p. 787-795, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2173-2>

Stokes, J.; McBride, E.; Wilson, C.G.; Girkin, J.M.; Smith, W.E.; Graham, D. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy as a sensitive and selective technique for the detection of folic acid in water and human serum. **Applied Spectroscopy**, v. 62, n. 4, p. 371-376, 2008. <https://doi.org/10.1366/000370208784046812>

Stosch, R.; Henrion, A.; Schiel, D.; Güttler, B. Surface-enhanced Raman scattering based approach for quantitative determination of creatinine in human serum. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 22, p. 7386-7392, 2005.
<https://doi.org/10.1021/ac0511647>

Talari, A.C.S.; Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I.U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 1, p. 46-111, 2015. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902>

Uskokovic-Markovic, S.; Jeliki-Stankov, M.; Holclajtner-Antunovi, I.; Durdevic, P. Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 32, p. 96-103, 2013. <https://doi.org/10.2478/jomb-2013-0004>

Van Duyne, R.P.; Zhang, X.; Shah, N.C. Sensitive and selective chem/bio sensing based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Vibrational Spectroscopy**, v. 42, n. 1, p. 2-8, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.02.001>

Wang, P.; Sun, J.; Zhang, T.; Liu, W. Vibrational spectroscopy approaches for the quality evaluation and authentication of virgin olive oil. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 10, p. 763-970, 2016. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1176034>

Williamson, A.M.; Snyder, M.L. **Wallach: Interpretação de exames laboratoriais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2016. p. 1250. Disponível em: <http://imunoped.fmrp.usp.br/wp-content/uploads/sites/461/2019/05/Interpretac%CC%A7a%CC%83o-de-Exames-Laboratoriais-Wallach-10Ed.pdf>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2022.

Yang, J.; Xu, P.; Wu, S.; Chen, Z.; Fang S; Xiao, H.; Hu, F.; Jiang, L.; Wang, L.; Mo, B.; Ding, F.; Lin, L.L.; Ye, J. Raman spectroscopy for esophageal tumor diagnosis and delineation using machine learning and the portable Raman spectrometer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 317, n. 5, p. 124461, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124461>

ANEXO

Portal do Governo Brasileiro

Plataforma Brasil

hegiana@gmail.com

Esqueceu a senha? Cadastre-se v4.0.7_rc03

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL NA QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS EM SANGUE HUMANO
Pesquisador Responsável: HECTOR ENRIQUE GIANA
Contato Público: HECTOR ENRIQUE GIANA
Condições de saúde ou problemas estudados: Diabetes, hiperlipidemias e doença renal
Descritores CID - Gerais: Diabetes mellitus insulino-dependente, Diabetes mellitus relacionado com a desnutrição, Diabetes mellitus nao-insulino-dependente, Outros tipos especificados de diabetes mellitus, Diabetes mellitus nao especificado, Insuficiência renal aguda, Distúrbios do metabolismo de lipoproteínas e outras lipidemias, Doença renal crônica, Insuficiência renal nao especificada
Descritores CID - Específicos: Diabetes mellitus insulino-dependente, Diabetes mellitus relacionado com a desnutrição, Diabetes mellitus nao-insulino-dependente, Outros tipos especificados de diabetes mellitus, Diabetes mellitus nao especificado, Insuficiência renal aguda, Distúrbios do metabolismo de lipoproteínas e outras lipidemias, Doença renal crônica, Insuficiência renal nao especificada
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 11/05/2023

DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: ISCP - SOCIEDADE EDUCACIONAL LTDA.
Cidade: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5492 - Universidade Anhembí Morumbi
Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, nº 1.134
Telefone: (11)2790-4558
E-mail: cep.uam@animaeducacao.com.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA



[Voltar](#)

Portal do Governo Brasileiro

Plataforma Brasil

hegiana@gmail.com

Esqueceu a senha? Cadastre-se v4.0.7_rc03

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL NA QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS EM SANGUE HUMANO
Pesquisador Responsável: HECTOR ENRIQUE GIANA
Contato Público: HECTOR ENRIQUE GIANA
Condições de saúde ou problemas estudados: Diabetes, hiperlipidemias e doença renal
Descritores CID - Gerais: Diabetes mellitus insulino-dependente, Diabetes mellitus relacionado com a desnutrição, Diabetes mellitus nao-insulino-dependente, Outros tipos especificados de diabetes mellitus, Diabetes mellitus nao especificado, Insuficiência renal aguda, Distúrbios do metabolismo de lipoproteínas e outras lipidemias, Doença renal crônica, Insuficiência renal nao especificada
Descritores CID - Específicos: Diabetes mellitus insulino-dependente, Diabetes mellitus relacionado com a desnutrição, Diabetes mellitus nao-insulino-dependente, Outros tipos especificados de diabetes mellitus, Diabetes mellitus nao especificado, Insuficiência renal aguda, Distúrbios do metabolismo de lipoproteínas e outras lipidemias, Doença renal crônica, Insuficiência renal nao especificada
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 11/05/2023

DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: ISCP - SOCIEDADE EDUCACIONAL LTDA.
Cidade: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5492 - Universidade Anhembí Morumbi
Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, nº 1.134
Telefone: (11)2790-4558
E-mail: cep.uam@animaeducacao.com.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA



