



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESPECTROSCOPIA DE RAMAN PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

por

Diana Filipa Amorim Dantas

Julho 2019



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESPECTROSCOPIA DE RAMAN PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

por

Diana Filipa Amorim Dantas

Local: Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, Tecnologia e Ciência (INESC
TEC) e Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto/Instituto de Nanotecnologias
(IFIMUP/IN)

Orientação: Doutora Susana Silva

Julho 2019

Aos meus pais, Conceição Dantas e Adelino Dantas, por me proporcionarem caminhar até aqui e me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu irmão, Bruno Dantas, que apesar de estar longe é um exemplo para mim.

Aos meus sobrinhos, Francisco e Artur, que enquanto crianças genuínas me fazem ver o mundo de uma forma melhor.

Ao meu namorado, Davide Matos, que me acompanha no caminho da vida há 8 anos, e sempre esteve ao meu lado.

Dedico-vos esta conquista com todo o meu amor!

*“Sempre chega a hora em que descobrimos que
sabíamos muito mais do que antes julgávamos.”*

(José Saramago)

Resumo

A técnica de Espetroscopia de Raman testemunhou um avanço rápido nos últimos anos, e os interesses crescentes da investigação e da indústria fortaleceram ainda mais a sua aplicação. Nos últimos anos, este rápido desenvolvimento promoveu o uso da Espetroscopia de Raman numa ampla variedade de novas aplicações, incluindo áreas de segurança alimentar, deteção de qualidade, controle de qualidade farmacêutica, análises forenses e biomédicas.

A Espetroscopia de Raman é uma técnica ótica de alta resolução, sendo uma poderosa técnica espectroscópica vibracional que permite num curto espaço de tempo diferenciar estruturas moleculares baseadas no espalhamento inelástico da luz monocromática, como a luz laser. A Espetroscopia de Raman mede os modos vibracionais de uma amostra.

Um espectro consiste numa distribuição de comprimento de onda de picos correspondentes às vibrações moleculares específicas da amostra que está a ser analisada. Trata-se de uma técnica de análise que se realiza diretamente sobre o material a ser estudado, sendo uma análise não-invasiva e não-destrutiva, com vantagens como utilização de pequenas quantidades amostrais, não necessita de preparação prévia da amostra a analisar, não origina alteração da superfície nem a sua destruição, e é célere na realização da análise.

O estudo prático consiste na análise de amostras de duas naturezas distintas, farmacêutica e orgânica animal. As farmacêuticas têm como objetivo o estudo da sensibilidade do equipamento, através da análise de aspirinas e paracetamol no estado sólido e líquido.

Por outro lado, as amostras orgânicas surgem numa vertente mais complexa, sendo o foco um estudo às cegas (*blind tests*) de tecido mamário de fêmeas, *Felis catus domesticus*, onde se pretende verificar através dos resultados se há alterações no padrão morfológico que sejam potenciais indicadores de patologia.

Palavras-chave: *Espetroscopia de Raman, Espectro, Área Oncológica, Área Farmacêutica, Análise, Amostras.*

Abstract

The Raman spectroscopy technique has witnessed a rapid advancement in recent years, and the growing interests of research and industry have further strengthened its application. In recent years, this rapid development has promoted the use of Raman spectroscopy in a wide variety of new applications, including food safety areas, quality detection, pharmaceutical quality control, forensic and biomedical analysis.

Raman spectroscopy is a high-resolution photonics technique, being a powerful vibrational spectroscopic technique that allows in a short time to differentiate molecular structures based on the inelastic scattering of monochrome light, such as Laser light. Raman spectroscopy measures the vibrational modes of a sample.

A spectrum consists of a wavelength distribution of peaks corresponding to the specific molecular vibrations of the sample being analyzed. It is an analysis technique that is performed directly on the material to be studied, being a non-invasive and non-destructive analysis, with advantages such as the need for small sample quantities, practically no preparation of the specimen, no sample destruction, which does not lead to any alteration of the surface and little time to perform the analysis.

The practical study consists of the analysis of samples of two distinct natures, pharmaceutical and organic animal. The pharmaceutical companies aim to study the sensitivity of the equipment through the analysis of aspirins, paracetamol in the solid and liquid state.

On the other hand, organic samples emerge in a more complex strand, with the focus being a blind tests of breast tissue of females, *Felis catus domesticus*, where it is intended to verify through the results if there are alterations in the morphological pattern that are potential indicators of pathology.

Keywords: *Raman Spectroscopy, Spectrum, Oncological Area, Pharmaceutical Area, Analysis, Samples.*

Agradecimentos

É com uma enorme satisfação que expresso aqui o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que estiveram envolvidas quer direta quer indiretamente na concretização deste trabalho e que me ajudaram a realizar mais uma etapa da minha formação académica.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Susana Silva, por me ter aceitado e me ter orientado mesmo estando a orientar vários alunos, por todas as opiniões e colaboração prestada. Expresso o meu profundo agradecimento pela orientação, profissionalismo, disponibilidade e paciência.

Ao Professor Doutor Joaquim Agostinho Moreira, por prescindir do seu tempo valioso para me auxiliar na concretização dos objetivos propostos. Pelas críticas e opiniões e, acima de tudo, pela colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda toda a sua disponibilidade e apoio, assim como a oportunidade de aprender um pouco mais e por todo o saber científico.

À Doutora Susana Novais e ao Doutor Rui Vilarinho, por toda a ajuda e disponibilidade durante todo o trabalho, por todo o conhecimento e ajuda prestada. Obrigada por estarem sempre presentes, e sobretudo por todo o auxílio neste desafio.

Ao Hospital Veterinário da Universidade de Évora, por prontamente me ter cedido as amostras que permitiram parte da realização deste trabalho.

À minha mãe, Conceição Dantas, por ser o meu pilar, por todo o seu amor, por todo o ensinamento e luta para que eu caminhasse até aqui. O meu sincero obrigada.

Ao meu pai, Adelino Dantas, que no seu silêncio me conseguiu transmitir toda a força e coragem, por tudo aquilo que me transmitiu e por toda a luta para eu seguir o caminho que escolhi. O meu sincero obrigada.

Ao meu irmão, Bruno Dantas, e aos meus sobrinhos, Francisco e Artur, por serem a minha inspiração, ao meu irmão porque vejo nele um exemplo e aos meus sobrinhos porque são as pessoas mais genuínas que me fazem ver o mundo de uma forma melhor. Obrigada de coração.

Ao meu namorado, Davide Matos, por acreditar em mim e me motivar mesmo quando tudo parecia difícil, mas sobretudo por estar sempre do meu lado tanto nos momentos bons como nos maus momentos. A ti, só te tenho a agradecer.

Aos meus Familiares e Amigos, por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades. A eles, dedico todo este trabalho.

A todos, um muito OBRIGADO!

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto:

POCI-01-0145-FEDER-029724 (ENDOR - Endoscope based on New Optical Fibre Technology for Raman Spectroscopy) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



INVESTIGADOR
FCT

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Agradecimentos	xi
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
Introdução	1
1.1. Motivação	3
1.2. Objetivos	4
1.3. Organização da dissertação	5
1.4. Contribuições da tese de mestrado	5
2. Fundamentos teóricos	7
2.1. Conceito de Raman	7
2.2. Breve revisão da Espectroscopia de Raman	8
2.3. Aplicações médicas	13
2.3.1. Área Farmacêutica	13
2.3.2. Área Oncológica	17
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Caracterização das amostras	19
3.1.1. Amostras farmacêuticas	19
3.1.2. Amostras orgânicas	21
3.2. Instrumentação - Espectrômetro	21
3.3. Calibração com padrão silício	22
3.4. Preparação da amostra	23
3.5. Procedimento de análise de amostras	24
3.6. Parâmetros de aquisição dos espectros Raman	24
3.7. Processamento de dados	25

3.7.1. Interpretação do espectro	25
4. Resultados e Discussão	29
4.1. Amostras farmacêuticas.....	29
4.1.1. Aspirina.....	30
4.1.2. Ben-u-ron	31
4.1.3. Paracetamol líquido	32
4.2. Amostras orgânicas	35
5. Conclusões e Trabalhos Futuros	42
6. Apêndices.....	42
Referências Bibliográficas	48

Lista de Figuras

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Figura 2.1. Três tipos de espalhamento Raman: Rayleigh, Stoke e Anti-Stoke	10
Figura 2.2. Espectro Raman: Intensidade <i>versus</i> deslocamento Raman (cm^{-1}). Representação das regiões características do espectro	11
Figura 2.3. Instrumentação típica de um espectrômetro Raman com um laser NIR acoplado a um microscópio	12
Figura 2.4. Espectro Raman característico da aspirina	14
Figura 2.5. Espectro Raman característico do paracetamol	15
Figura 2.6. Espectros Raman de amostras de cocaína em diferentes formas: (A) pasta Freebase amarela, (B) pasta Freebase branca, (C) “crack rock”, (D) pó de cloridrato de cocaína, e (E) pó de cocaína Freebase.....	16
Figura 2.7. (a) Espectro Raman do tecido mamário cancerígeno após pré-processamento. (b) Espectro Raman do tecido mamário normal após pré-processamento	17

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Figura 3.1. Espectrômetro confocal Raman InVia™ Qontor® com microscópio integrado presente no laboratório do IFIMUP/IN.	21
Figura 3.2. Lasers utilizados de 532, 633 e 785 nm.....	22
Figura 3.3. Espectro de calibração obtido por medição do silício numa das análises realizadas	23
Figura 3.4. Ruídos típicos de um espectro Raman obtido de óleo mineral	27

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Figura 4.1. Espectro Raman obtido através da análise comparativa das diferentes aspirinas e da substância ativa no estado puro.	30
Figura 4.2. Espectro Raman obtido através da análise comparativa dos diferentes laboratórios de paracetamol e também no estado puro.	31
Figura 4.3. Espectro Raman correspondente à análise do etanol.....	32
Figura 4.4. Espectro Raman das amostras 0 a 4 (Tabela 3.3) do paracetamol líquido, indicando as bandas indicadoras da presença de etanol.....	33
Figura 4.5. Espectro Raman do estudo do paracetamol líquido demonstrando o aparecimento de bandas da amostra 0 (mínimo de concentração) para as restantes amostras (1-9), com indicação do pico do etanol a $435.6 (\text{cm}^{-1})$	33

Figura 4.6. Relação da área em função da concentração das bandas 328.5, 385.4 e 506.5 cm^{-1} da análise do paracetamol líquido.	34
Figura 4.7. Relação da área em função da concentração da banda a 435.6 cm^{-1} do etanol. ...	35
Figura 4.8. (a) Imagens microscópicas das regiões analisadas, correspondentes às amostras 1 e 2; (b) e a respetiva análise espectral.....	36
Figura 4.9. (a) Imagem microscópica da região analisada, correspondente à amostra 3; (b) e a respetiva análise espectral.....	38

Lista de Tabelas

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Tabela 2.1. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário cancerígeno.....18

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Tabela 3.1. Composição da aspirina GR e do ácido acetilsalicílico Pharmakern 19

Tabela 3.2. Composição do Ben-u-ron e do paracetamol Alter 20

Tabela 3.3. Caracterização das amostras de paracetamol 20

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Tabela 4.1. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário..... 37

Tabela 4.2. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário..... 39

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> (Ingrediente Farmacêutico Ativo)
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i> (Dispositivo de carga acoplada)
CE	Corrente Escura
CT	<i>Computed Tomography</i> (Tomografia Computadorizada)
EL	Erro de Leitura
EM	Eletromagnético
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
FP	<i>Fingerprint</i> (Impressão digital)
GIC	<i>Gastrointestinal Cancer</i> (Cancro Gastrointestinal)
GIST	<i>Gastrointestinal Stromal Tumor</i> (Sarcoma do Estroma Gastrointestinal)
GR	Gastrorresistente
HCl	Ácido Clorídrico
HC-PCF	<i>Hollow Core-Photonic Crystal Fiber</i> (Fibras de Cristal Fotónico do Núcleo Oco)
He-Ne	Hélio-Néon
H. PYLORY	<i>Helicobacter pylori</i>
HW	<i>High Wavenumber</i>
IFIMUP/IN	Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto/Instituto de Nanotecnologias
IM	<i>Intestinal Metaplasia</i> (Metaplasia Intestinal)
INESC TEC	Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, Tecnologia e Ciência
JEFFA	Jornadas em Engenharia Física, Física e Astronomia
MRI	<i>Magnetic Resonance Image</i> (Imagem por Ressonância Magnética)
Nd:YAG	<i>Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet</i> (Neodímio-Dopado Granada de Ítrio e Alumínio)
NIR	<i>Near Infrared</i> (Próximo de Infravermelho)
PAT	<i>Process Analytical Technology</i> (Tecnologia Analítica de Processo)

PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por Emissão de Positrões)
POF	<i>Polymer Optical Fiber</i> (Polímero de Fibra Ótica)
ARN	Ácido Ribonucleico
RQ	Ruído Quântico
SNR	<i>Signal-to-Noise Ration</i> (Relação Sinal-Ruído)
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta

Introdução

Estima-se, de acordo com a Globocan 2018, que em 2018, existem 18,1 milhões de novos casos de cancro e 9,6 milhões de mortes por esta doença globalmente. Apesar dos avanços tecnológicos no âmbito da deteção precoce e do tratamento, esta doença continua a ser uma das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial, independentemente do nível de desenvolvimento humano (Bray *et al.*, 2018). Nas próximas décadas, espera-se um aumento destes valores, nomeadamente em países em desenvolvimento, onde o acesso a preços acessíveis assim como a tecnologia médica é por vezes deficitário, tornando-se uma problemática.

Atualmente, os métodos de diagnóstico do cancro envolvem tipicamente o uso da Histopatologia de Biópsia ou tecido ressecado (ou a citologia do sangue no caso de malignidades hematológicas) e também modalidades de imagem radiológica, tais como, Imagem por Ressonância Magnética (MRI), Ultrassom (US), Tomografia Computadorizada (CT), imagem por Raios-Gama e por último Tomografia por Emissão de Positrões (PET) (Jermyn *et al.*, 2016).

Estes métodos apresentam um carácter dispendioso e moroso, não sendo ideais para o uso intra-operativo. Além disso, muitas vezes não conseguem caracterizar completamente a extensão do cancro ou mesmo detetar tumores de menor dimensão. Continua a existir uma necessidade urgente de melhorar ou complementar as tecnologias inerentes à deteção, caracterização e localização do cancro (Jermyn *et al.*, 2016).

Na área oncológica, a Espetroscopia de Raman tem sido bastante explorada pois apresenta um carácter altamente sensível às alterações das assinaturas moleculares nos diversos tipos de cancro, contando com inúmeros estudos no âmbito dos diagnósticos médicos, nomeadamente sobre o diagnóstico do cancro gástrico (Santos *et al.*, 2017; Kong, Kendall, Stone & Notingher, 2015). É utilizada quer *ex vivo* quer *in vivo* para o diagnóstico precoce, orientação da biópsia e orientação de cirurgia (Santos *et al.*, 2017).

Além disso, as tecnologias de imagem ótica estão a ser bastante investigadas para melhorar o diagnóstico e o tratamento do cancro, pois desta forma podem fornecer uma avaliação rápida, e em tempo real dos tecidos, com um elevado grau de visualização (Li, Wang, Liu & Zhang, 2015). A Espetroscopia de Raman é uma técnica ótica cada vez mais considerada como um método valioso para o diagnóstico do tecido mamário (Zheng *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a Espetroscopia de Raman tem sido aplicada numa ampla variedade de novas aplicações, incluindo áreas de segurança alimentar e deteção de qualidade, controle de qualidade farmacêutica, análises forenses e biomédicas (Chao *et al.*, 2017).

A Espetroscopia de Raman é uma ferramenta de *Process Analytical Technology* (PAT) estabelecida. Desde a década de 1980, esta tem sido utilizada para estudar *Active Pharmaceutical Ingredients* (API). Como uma ferramenta para análise de API foi descrita numa vasta gama de aplicações, incluindo a identificação do polimorfo, análise quantitativa, monitoração *in situ* da cristalização, teste da libertação em tempo real, operações de unidade farmacêutica, e transformações induzidas pelo processo. Além de identificar formas polimórficas isoladas, as misturas de formas podem ser analisadas e quantificadas (Esmonde-White, Cuellar, Uerpmann, Lenain & Lewis, 2017). Esta técnica espectroscópica provou ser uma ferramenta valiosa e precisa, sendo considerada uma poderosa técnica analítica que permite diagnosticar doenças e estudar o tecido biológico. Desta forma, permite medir a composição química de amostras biológicas complexas, tais como, amostras de biofluidos, células e tecidos.

O potencial desta Espetroscopia surge da sua capacidade de detetar alterações bioquímicas a um nível molecular e, portanto, pode ser utilizada para diagnósticos, prognósticos ou como ferramenta para a avaliação de novas terapias (Kong *et al.*, 2015). Uma das maiores vantagens prende-se com a elevada capacidade para identificar marcadores associados à alteração maligna (Kallaway *et al.*, 2013). Além disso, esta Espetroscopia apresenta diversas características, sendo de destaque a elevada especificidade química e a importante informação molecular que pode ser obtida.

No entanto, a Espetroscopia de Raman pode associar-se a outras tecnologias avançadas de microscopia ótica, tais como fibras óticas, lasers miniaturizados e outros dispositivos fotónicos, de modo a melhorar o desempenho e a velocidade do diagnóstico (Kong *et al.*, 2015).

A Espetroscopia de Raman através da assinatura de nível molecular da composição bioquímica e estrutura das células que possui, com uma resolução espacial ao nível submicrométrico, pode ser bastante útil para monitorar as alterações na composição inerente ao estágio inicial de diagnóstico não-invasivo do cancro, quer *ex vivo* quer *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2017).

Um espectro de Raman representa uma “região de impressão digital” molecular da amostra e fornece a informação quantitativa inerente à sua composição química. Assim, alterações bioquímicas em células e tecidos, que podem ser causados ou são a causa de uma doença, podem levar a mudanças significativas nos espectros de Raman (Kong *et al.*, 2015). A "região de impressão digital" Raman, compreendida entre 400 e 1800 cm^{-1} , é a região que se

correlaciona com as vibrações moleculares de importância bioquímica, demonstrando ser bastante promissora para finalidades óticas (Carvalho *et al.*, 2017).

A coleta de espectros pode ser realizada *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, sem perturbar o ambiente celular. Esta é uma grande vantagem da Espetroscopia de Raman, como a maioria dos ensaios biológicos utilizam biomarcadores químicos e muitas vezes requerem condições não-nativas para o ambiente biológico. Os dados publicados mostram claramente que a Espetroscopia de Raman é capaz de discriminar entre tecidos malignos e pré-malignos de tecidos normais, apresentando uma alta sensibilidade e especificidade (Jermyn *et al.*, 2016).

A técnica espectroscópica de Raman pode ser adaptada num endoscópio por meio de fibras óticas, de natureza distinta. Essas fibras podem ser convencionais de sílica; do tipo microestruturadas; de cristal fotónico do núcleo oco (HC-PCF) e do tipo plástico (*Polymer Optical fiber* - POF) com estruturas microestruturadas de núcleo oco.

1.1. Motivação

Na base da elaboração deste estudo encontra-se, antes de mais, um forte interesse em realizar um trabalho de índole essencialmente prática na área da investigação. Nesse contexto surgiu uma proposta no âmbito da Espetroscopia de Raman onde surge, assim, a análise de amostras por Espetroscopia de Raman numa ampla vertente de aplicações biomédicas. Além disso, há que referir o facto de haver a possibilidade de trabalhar com um equipamento novo, inovador em Portugal, onde há uma forte necessidade de perceber o seu conteúdo evolutivo, o seu funcionamento, a sua sensibilidade bem como a sua potencialidade. É bastante importante perceber todo o procedimento, desde a calibração até à análise propriamente dita.

Apesar de o tema da dissertação já ter sido alvo de alguns trabalhos de pesquisa por membros do Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto, Instituto de Nanotecnologias (IFIMUP/IN), este surge numa vertente diferente. Aliado ao novo equipamento existe o estudo de amostras farmacêuticas e orgânicas animais.

Na área farmacêutica, mais concretamente a análise de amostras líquidas nem sempre foi de fácil realização, é necessário perceber o ponto concreto de focagem das mesmas.

A análise de amostras orgânicas não é um campo simples, mas sim bastante complexo, pois os tecidos apresentam comportamentos característicos que dificultam a medição, nomeadamente a desidratação, uma vez que os mesmos se encontravam em formol. Aliado a tudo isto, salienta-se que são necessárias várias amostragens quer de um mesmo local quer de vários locais da amostra.

Esta técnica requer muito rigor, é necessário um conjunto de etapas até à obtenção do espectro e nem sempre se obtém um espectro viável. Além disso, não se pode apenas obter um espectro e tirar dele todas as ilações, para que os resultados sejam viáveis, são necessários inúmeros espectros de forma a observar se existe um padrão, onde se verifica homogeneidade ou heterogeneidade. A acrescer a este facto está todo o conjunto de tratamento de dados que é necessário realizar para que seja possível retirar todas as conclusões interpretativas.

É de salientar que esta técnica ainda se encontra numa fase de crescimento, expansão e de investigação.

Este projeto de investigação resulta assim, de duas partes, uma dedicada à parte farmacêutica, onde são analisadas amostras sólidas e líquidas e outra que contempla a parte oncológica, onde são analisadas amostras de tecido mamário de gatos domésticos, mais concretamente, fêmeas, (*Felis catus domesticus*).

Ao observar, de forma geral, a literatura existente sobre ambas as áreas de estudo, verifica-se que a área oncológica, especificamente, a área direcionada à parte mamária, revela diversas opiniões pois a posterior análise nem sempre é concordante uma vez que, está relacionada com os componentes celulares. Dos estudos que se encontram efetuados na área da oncologia, os que se relacionam sobretudo com o cancro da mama, apresentam-se um pouco negligenciados. Verifica-se que sobretudo esta área carece de esclarecimentos, pois são verificáveis diversas lacunas aquando da leitura de alguns textos da especialidade.

Assim, a análise de amostras de tecido mamário através desta técnica é fortemente importante, permitindo avanços e sobretudo colmatar lacunas nesta área.

Para além do exposto acresce-se o facto de a autora deste trabalho ter realizado uma pequena experiência na área da investigação biomédica no âmbito da dissertação de mestrado que integra o segundo semestre pertencente ao segundo ano de Mestrado em Engenharia Biomédica. Após a realização deste pequeno estudo de investigação, houve um progresso no que diz respeito à técnica, foi um processo de aprendizagem não só interpretativa, mas de contacto com um equipamento real e com tudo o que ele engloba, ainda assim muitas questões permaneceram sem resposta.

1.2. Objetivos

O presente projeto de investigação tem como principal objetivo o contacto com um novo equipamento Raman, sendo o foco a análise de amostras orgânicas e farmacêuticas, incluindo este último grupo, amostras sólidas e líquidas.

Com este estudo de investigação pretende-se sobretudo que este seja um processo de aprendizagem a vários níveis, tais como, compreender melhor o próprio equipamento, sendo ele uma nova aquisição e por isso, devem ser analisadas as suas melhorias evolutivas, perceber o seu funcionamento na íntegra, todo o procedimento que deve ser realizado até à análise da amostra que se pretende estudar e por último, perceber que informações são retiradas dos espectros obtidos, sendo estes os objetivos específicos.

1.3. Organização da dissertação

O presente documento está estruturado em 6 capítulos sendo que estes descrevem toda a evolução deste projeto, desde os fundamentos teóricos até à parte prática correspondente à análise de amostras e respetivos resultados.

O capítulo 1 apresenta uma breve introdução ao projeto de investigação, onde são explicados os objetivos e metodologias do trabalho desenvolvido.

No capítulo 2 encontra-se representado o estado da arte, capítulo onde se aborda a literatura do tema e onde são apresentados os conceitos chave para a compreensão deste estudo.

O capítulo 3 correspondente aos materiais e métodos, contempla toda a parte experimental do projeto em questão, desde o equipamento utilizado, passando pelo procedimento da técnica até à caracterização das amostras que foram analisadas.

No capítulo 4 são abordados os resultados obtidos através da posterior análise dos espectros obtidos.

Por fim, no capítulo 5 são tecidas as conclusões finais do trabalho de investigação, elaboradas através da resposta aos objetivos propostos, assim como todas as perspetivas de trabalhos de melhoria futuros que devem ser realizados neste âmbito.

Salienta-se ainda que no final deste projeto é apresentado, nos apêndices (capítulo 6) um estudo preliminar da Espectroscopia de Raman no cancro do estômago, estudo que será futuramente aprofundado, e ainda é descrita toda a bibliografia consultada.

1.4. Contribuições da tese de mestrado

O presente projeto de pesquisa provém de uma parceria com o Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, Tecnologia e Ciência (INESC TEC), assim como com o IFIMUP/IN, ambos situados na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) sendo esta instituição a responsável pela proposta e pela realização deste trabalho.

Este projeto contribuiu para as Jornadas em Engenharia Física, Física e Astronomia (JEFFA), tendo esta como missão a transmissão aos alunos do atual panorama das várias áreas e assim, dos principais desafios.

Com este desafio, procura-se uma abordagem de aprendizagem e contacto com o novo equipamento Raman. Além disso, procura-se colmatar lacunas na análise das amostras nomeadamente orgânicas, sendo este um campo complexo que deve ser futuramente explorado.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Conceito de Raman

O fenómeno do espalhamento inelástico da luz foi previsto em 1923 por Smekal e observado experimentalmente, pela primeira vez pelo indiano Chandrasekhara Venkata Raman (Raman e Krishnan), em 1928, premiado com um Nobel da Física e, por esse motivo denominado Efeito Raman (Li & Church, 2014; Zavaleta *et al.*, 2013). Juntamente com Kori, publicou o seu primeiro artigo sobre esta técnica (Bumbrah & Sharma, 2016). No entanto, a medição deste efeito não foi amplamente implementada até ao final dos anos 1960 devido à falta de tecnologias apropriadas, tais como, lasers, espectrógrafos e detetores, não sendo relatado para aplicações biomédicas até à data de 1970 (Kumamoto, Harada, Takamatsu & Tanaka, 2018).

Com o aparecimento de melhorias subsequentes nas fontes de luz e de deteção de sinais tornou-se possível a aplicação de técnicas de Espetroscopia de Raman numa ampla gama de aplicações biológicas (Jermyn *et al.*, 2016). No final da década de 60, o efeito Raman foi aplicado a uma variedade de constituintes biológicos e, conseqüentemente, foram acumuladas bases espetrais para os nucleótidos, péptidos, lípidos e outros componentes, incluindo apatites, fibrilas e pigmentos.

A partir da década de 1970, a Espetroscopia de Raman permitiu revelar composições moleculares em células vivas e tecidos biológicos, como ossos, dentes, nervos, músculos, artérias, olhos, sangue e urina (Kumamoto *et al.*, 2018). Embora a descoberta tenha ocorrido em 1928, o número de publicações permaneceu baixo até a década de 1960. Os dados científicos indicam que houve um aumento no número de publicações na década seguinte à invenção dos lasers, seguido de um crescimento constante no número de publicações (Kuhar, Sil, Verma & Umapathy, 2018).

Foi aplicado constantemente como meio de investigação em vibrações e em rotações moleculares. Em paralelo, surgiu a invenção do laser que veio permitir o avanço da instrumentação do espectrómetro de Raman. Com a aplicação do laser de rubi pulsado recém desenvolvido na altura, com um comprimento de onda de 694,3 nm, dois grupos registaram com sucesso os espectros de Raman do tetracloreto de carbono e do benzeno, em 1962 (Li & Church, 2014).

A Espetroscopia de Raman é uma técnica vibracional ótica que utiliza um laser com base no princípio fundamental da dispersão de luz inelástica fornecendo informações detalhadas sobre as vibrações de ligações moleculares (Wang *et al.*, 2015). Descreve o fenómeno de espalhamento inelástico da luz na qual os fotões incididos sobre a amostra transferem energia

para os diferentes modos vibracionais moleculares, revelando informações a nível químico com bastante detalhe.

É um processo no qual uma molécula, simultaneamente, absorve um fóton incidente e emite um fóton de Raman acompanhado de uma transição de um nível de energia para outro, levando a uma mudança do número de onda (cm^{-1}) do fóton emitido (Vargas-Obieta *et al.*, 2016). As vibrações provocadas pela diferente quantidade de energia dão-nos informação acerca das estruturas químicas e formas físicas da amostra em estudo, e servem para identificar substâncias a partir dos padrões espectrais característicos da “região de impressão digital” e determinar quantitativa ou semi-quantitativamente a quantidade de uma substância numa amostra. As amostras podem ser examinadas em diferentes estados físicos: sob a forma de sólidos, líquidos ou vapores, em estado quente ou frio, a granel, material não cristalino, como partículas microscópicas ou como camadas superficiais (Wiley & Sons, 2008).

A maioria dos fótons são espalhados de forma elástica quando interagem com a matéria, onde se verifica que os fótons dispersos mantêm a mesma energia bem como o comprimento de onda que os fótons incidentes (Jermyn *et al.*, 2016). No entanto, uma pequena fração de luz é dispersa inelasticamente, o que significa que os fótons inelásticos dispersos linearmente de uma forma geral perdem energia, resultando num comprimento de onda mais longo (Zavaleta *et al.*, 2013).

O efeito Raman verifica-se quando um feixe de luz monocromática incide na amostra, interagindo com as moléculas da mesma, e parte da radiação é dispersa inelasticamente. Uma grande parte da radiação dispersa apresenta a mesma frequência da radiação incidente (dispersão elástica ou de Rayleigh), sendo uma pequena parte dispersa a frequências diferentes da do feixe incidente, constituindo a dispersão de Raman.

Os espectros Raman surgem devido à colisão inelástica entre a radiação monocromática incidente e as moléculas da amostra. Em termos clássicos, este fenómeno pode ser descrito como resultado de colisões inelásticas entre fótons e moléculas, que podem levar a trocas de energias em ambos os sentidos: fóton-molécula e molécula-fóton (Kim, 2015).

2.2. Breve revisão da Espectroscopia de Raman

A Espectroscopia de Raman é uma técnica espectroscópica de dispersão que permite estudar os níveis de energia vibracionais das moléculas. É uma técnica ótica com uma capacidade de ser minimamente ou mesmo não invasiva, que permite determinar a informação molecular do

tecido biológico. Na Espetroscopia convencional de Raman, a amostra é irradiada com radiação ultravioleta (UV), visível ou próxima de infravermelho (NIR) do espectro eletromagnético (EM).

A radiação eletromagnética é caracterizada por um comprimento de onda (comprimento de uma onda), uma frequência, (o número de vibrações por unidade de tempo), e um número de onda (o número de ondas por unidade de comprimento), através das expressões representadas pelas seguintes equações

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.2.1)$$

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} \quad (2.2.2)$$

$$\omega = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (2.2.3)$$

onde λ é o comprimento de onda, c a velocidade da luz no vácuo, ν a velocidade da luz num meio material, ΔE a variação da energia, h a constante de Planck e o ω a frequência angular.

Quando a luz laser incide, induz uma mudança de polarização das moléculas, uma pequena parte dos fótons incidentes (~ 1 em 10^8) é inelasticamente dispersa com os deslocamentos de frequência correspondentes aos modos vibracionais ativos Raman específicos das moléculas da amostra (Lin *et al.*, 2016).

O espalhamento de Raman provém de interações fóton-molécula, de onde resultam dois fótons. Um fóton é incidente e tem frequência ν_0 , sendo o outro fóton espalhado com frequência ν_s . A diferença de frequências presente em ambos os fótons, está relacionada com a separação do nível de energia vibracional. De acordo com a teoria clássica, a atividade de Raman surge das interações do campo elétrico da radiação eletromagnética de frequência ν_0 com espécies moleculares que possuem uma polaridade. Essas interações induzem momentos de dipolos temporários (Li & Church, 2014).

Estes dipolos oscilantes emitem luz de três frequências diferentes quando eles retornam ao menor nível de energia. O espalhamento de Raman pode ser maior ou menor que a energia incidente (espalhamento Anti-Stokes e Stokes, respetivamente) e essa diferença é igual à transição vibracional da molécula. As linhas de Stokes resultam de um fenómeno em que a frequência emitida é menor do que a frequência dispersa (Kim, 2015). Deslocam bandas de Raman que envolvem transições de níveis vibracionais de energia mais altos para níveis

vibracionais de energia mais baixos, dando origem a bandas de Stokes. São medidas em Espetroscopia de Raman convencional enquanto que as bandas Anti-Stokes são medidas com amostras fluorescentes uma vez que, a fluorescência provoca interferência com as bandas de Stokes (Bumrah & Sharma, 2016).

Um fóton com frequência ν_0 excita uma molécula Raman ativa que no momento da interação está no estado vibracional básico. Parte da energia do fóton é transferida para o modo Raman-ativo com frequência ν_m e a frequência resultante da luz dispersa é reduzida para $\nu_0 - \nu_m$ (**Figura 2.1**).

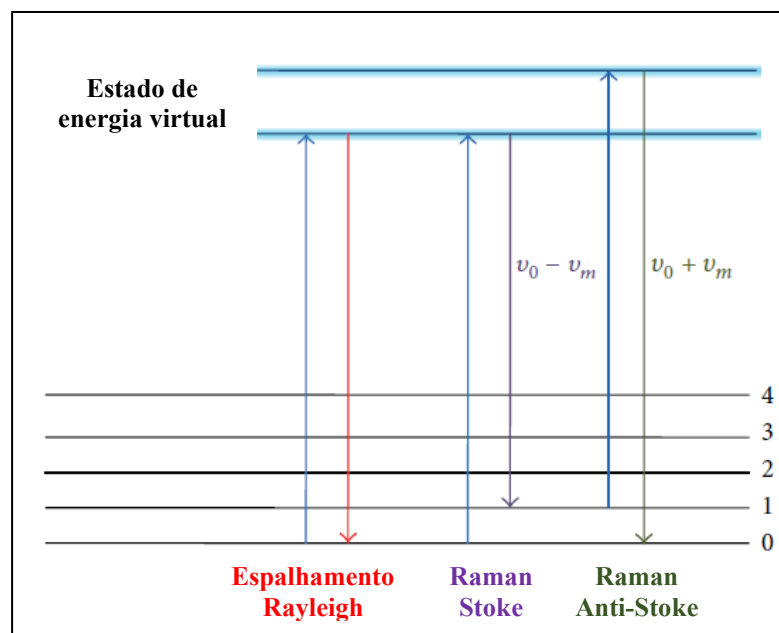


Figura 2.1. Três tipos de espalhamento Raman: Rayleigh, Stoke e Anti-Stoke. Adaptado de (Kim, 2015).

Quando uma frequência emitida é maior do que a frequência dispersa, este espalhamento é chamado como Anti-Stoke. São consideradas menos intensas do que as bandas de Stokes (Bumrah & Sharma, 2016). Um fóton com frequência ν_0 excitou uma molécula ativa de Raman, que, no momento da interação, já se encontra no estado vibracional excitado. A energia excessiva do modo ativo de Raman excitado é libertada, a molécula retorna ao estado vibracional fundamental e a frequência resultante de luz dispersa sobe para $\nu_0 + \nu_m$ (**Figura 2.1**). Apenas cerca de 0,1% dos fótons incidentes gera sinal de Raman com frequências $\nu_0 \pm \nu_m$, sendo que aproximadamente 99,999% da luz incidente sofre dispersão de Rayleigh, mas este sinal não é útil para caracterização a nível molecular. O espalhamento de Rayleigh é uma interação elástica entre um fóton e uma molécula, um fóton com a frequência ν_0 é absorvido por uma molécula com modo ativo de Raman. Assim, a molécula excitada retorna ao mesmo

estado vibracional fundamental e emite a luz com a mesma frequência ν_0 como um fóton da excitação (Kim, 2015).

O espectro de Raman compreende as designadas regiões de Stokes e de Anti-Stokes, que se localizam uma de cada lado da linha Rayleigh (**Figura 2.2**). As linhas Anti-Stokes são menos intensas que as de Stokes, porque implicam uma população inicial de um nível de energia vibracional excitado.

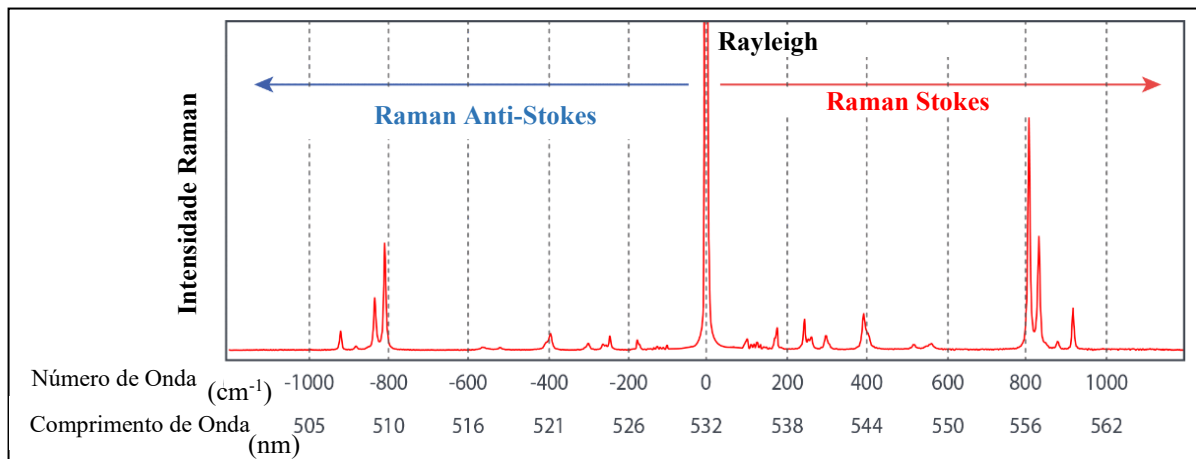


Figura 2.2. Espectro Raman: Intensidade *versus* deslocamento Raman (cm^{-1}). Representação das regiões características do espectro. Adaptado de (*Raman Spectrum* (Consultado em: 11/05/2019)).

O equipamento típico para Espectroscopia de Raman (**Figura 2.3**) integra uma fonte de excitação, um sistema de iluminação da amostra e um espectrómetro, para transmitir a luz laser à amostra que se pretende analisar. Normalmente é utilizado um laser NIR. Este é um laser diodo não ionizante utilizado como fonte de excitação, e compreende 785 nm, comprimento de onda muito estreito, para conseguir coletar a luz dispersa da amostra de interesse.

Numa primeira fase, extrai-se o tecido que se pretende analisar, ou coloca-se a amostra que se pretende analisar, sendo sobre a amostra incidido um feixe de luz. Aquando da incidência do feixe de luz sobre a amostra, as moléculas ganham vida e, criam vibrações de energia. Estas variações são detetadas através de um detetor, que posteriormente leva a informação que é considerada de interesse a ser codificada e processada como um sinal elétrico. Ao microscópio está associado um espectrómetro de Raman, também conhecido como espectrógrafo, instrumento utilizado para a análise química da amostra. Todas estas informações das vibrações moleculares vão ser transportadas até um computador, que emitirá os espectros característicos associados à amostra.

Assim, com a junção do microscópio e com o efeito de Raman consegue-se, em tempo real e com uma elevada especificidade, detetar alterações bioquímicas presentes nos tecidos. O

espectro obtido fornecerá informação molecular sobre a composição da estrutura e a bioquímica da amostra em estudo (Sun *et al.*, 2016; Fenn *et al.*, 2011).

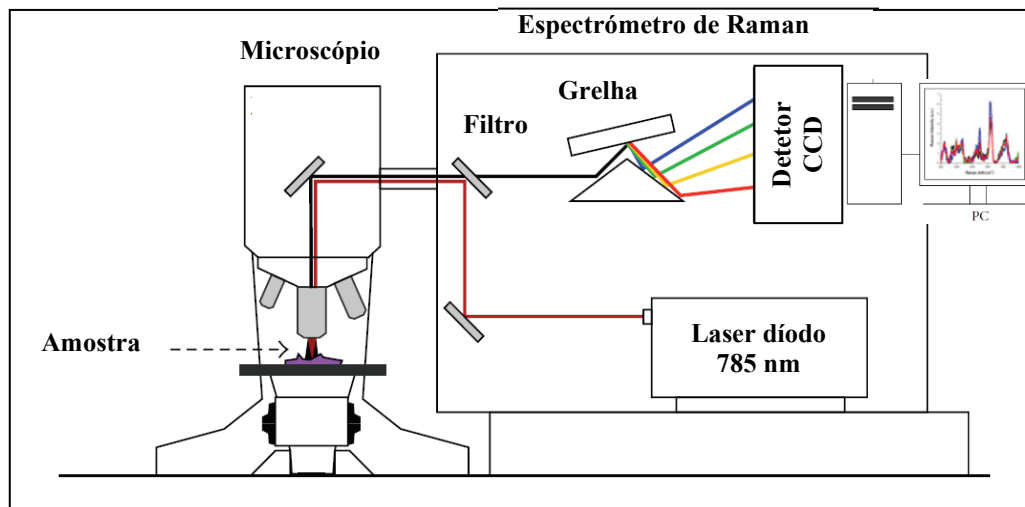


Figura 2.3. Instrumentação típica de um espectrômetro Raman com um laser NIR acoplado a um microscópio. Adaptado de (Fenn *et al.*, 2011).

Já foram coletados espectros Raman de pacientes, *in vivo*, submetidos à endoscopia do trato gastrointestinal (Kim, 2015; Akarsu, M., & Akarsu, C., 2018).

A Espetroscopia de Raman já foi implementada num endoscópio por meio de fibras óticas. Foram feitos vários esforços de modo a combinar ambas as tecnologias. Até ao momento, o desenvolvimento de uma sonda Raman de fibra ótica para uso endoscópico tem sido difícil devido à interferência espectral de fibras de sílica na região de impressão digital de $400\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ (Nijssen, Koljenović, Schut, Caspers & Puppels, 2009). O sinal de fundo das fibras de sílica, é um constrangimento uma vez que este faz desaparecer o fraco sinal Raman fornecido pela amostra. As fibras de sílica são frágeis e exibem tipicamente interferência multimodal quando utilizadas no comprimento de onda de operação visível necessária.

As fibras de excitação do tipo microestruturadas têm sido utilizadas como alternativa às fibras de sílica. No entanto, tais fibras apresentam tipicamente altas perdas na região do visível e do infravermelho próximo quando em comparação com as fibras convencionais de sílica. Além disso, grandes diâmetros são necessários (200-1000 micrómetros ou mais), a fim de serem usadas numa região do comprimento de onda no visível, podendo limitar significativamente a sua utilidade em sondas endoscópicas. Relativamente às fibras HC-PCF, estas têm vindo a ganhar grande importância com a emissão ótica de dispositivos (Cregan *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, várias publicações destacaram o seu uso em conjunto com vários tipos de técnicas espectroscópicas, sendo a maior parte do trabalho experimental focado nomeadamente na Espetroscopia de Raman de modo a superar as limitações devido à má transmissão ou

grandes diâmetros colocados por fibras do tipo capilar oco e de núcleo sólido. Uma PCF de núcleo-oco baseada em sílica já foi testada para Espetroscopia de Raman (Konorov, Addison, Schulze, Turner & Blades, 2006).

2.3. Aplicações médicas

2.3.1. Área Farmacêutica

A Espetroscopia de Raman provou ser uma ferramenta útil num vasto número de campos, nomeadamente, farmacêutico, estudos biomédicos *in vivo*, controle de processos, ciências ambientais e ciências forenses. As técnicas analíticas de Raman têm sido cada vez mais implementadas em diferentes estágios de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Isso inclui campos de identificação química, pesquisa de biologia molecular e diagnósticos, pré-formulação, triagem de forma sólida, bioanálise, análise de formulação em desenvolvimento de fármacos em fase tardia, análise de processos, controle de qualidade, qualificação de matéria-prima e identificação falsificada (Paudel, Rajjada & Rantanen, 2015).

A aplicação da Espetroscopia de Raman tornou-se bastante importante em várias áreas de estudo, particularmente na indústria farmacêutica, pois oferece grandes vantagens, tais como, nenhuma preparação da amostra, permite o estudo de substâncias líquidas e sólidas e os espectros podem ser obtidos sem promover a destruição da amostra. Esta ferramenta pode ser útil na identificação de matérias-primas e na determinação quantitativa de substâncias ativas em diferentes formulações. O uso da Espetroscopia de Raman fortalece grandemente as tecnologias analíticas de processo, que ao contrário dos estudos laboratoriais são mais rápidas e não necessitam de manuseio manual de amostras. A implementação desta técnica em atividades farmacêuticas pode trazer grandes benefícios como a avaliação da qualidade do produto, tornando este um resultado rápido, preciso e diminuindo os custos (Martínez *et al.*, 2012).

Na área farmacêutica, a Espetroscopia de Raman incide sobre o aspeto qualitativo (Lyndgaard, Berg & Juan, 2013). No entanto, técnicas espectroscópicas, tais como, Raman, NIR, visível e absorção de UV são rápidas, menos trabalhosas e têm sido utilizadas para análise qualitativa e quantitativa de paracetamol e dos seus políformos. A “impressão digital” molecular de compostos químicos pode facilmente ser feita com a ajuda da Espetroscopia de Raman e tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica.

Um dos “melhores” fármacos é o ácido acetilsalicílico sendo amplamente utilizado como analgésico e antipirético. Este composto é considerado instável e apresenta uma aparência cristalina e hidrolisável em água (Martínez *et al.*, 2012).

Na **Figura 2.4**, encontra-se representado o espectro Raman típico da aspirina juntamente com as bandas principais características.

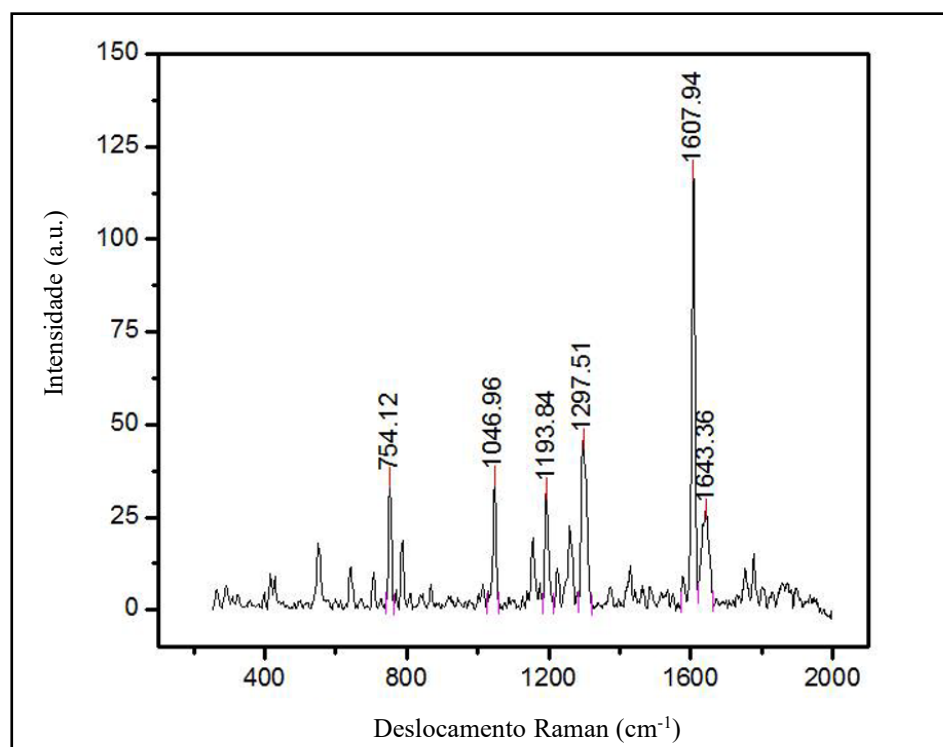


Figura 2.4. Espectro Raman característico da aspirina. Adaptado de (Acosta *et al.*, 2016).

Os espectros Raman da aspirina apresentam várias bandas na faixa espectral abaixo de 1500 cm^{-1} . As bandas mais características e mais fortes encontram-se na região espectral de 1045 e 1296 cm^{-1} , sendo a última atribuída à vibração OH.

Apresenta também outras bandas características na gama espectral de 1606 a 1622 cm^{-1} , que pode ser atribuída à simetria do anel aromático, à vibração do alongamento CC e à vibração do alongamento CO do grupo carboxilo, respetivamente. Junto da zona espectral correspondente a 3000 cm^{-1} , observam-se diversas vibrações CH em carbonos diferentes (Martínez *et al.*, 2012).

Além disso, são caracterizados e comparados os ingredientes entre comprimidos de paracetamol intactos, em fatias e na forma de pó utilizando a técnica da Espectroscopia de Raman. Ainda neste âmbito, os medicamentos falsificados estão a tornar-se uma questão alarmante sendo que, o paracetamol se encontra disponível em locais do mercado a granel, sem qualquer tipo de embalagem. Neste contexto, existe uma forte necessidade de comparar a impressão digital do espectro de Raman dos comprimidos de paracetamol falsificados com os da marca de laboratório.

O paracetamol, quimicamente N-(4-hidroxifenil) acetamida, é um analgésico não opióide de ação central e periférica, sendo também um antipirético, amplamente utilizado (Lakhwani, Sherikar & Mehta, 2013).

Na **Figura 2.5**, encontra-se representado o espectro Raman típico do paracetamol juntamente com as bandas principais características.

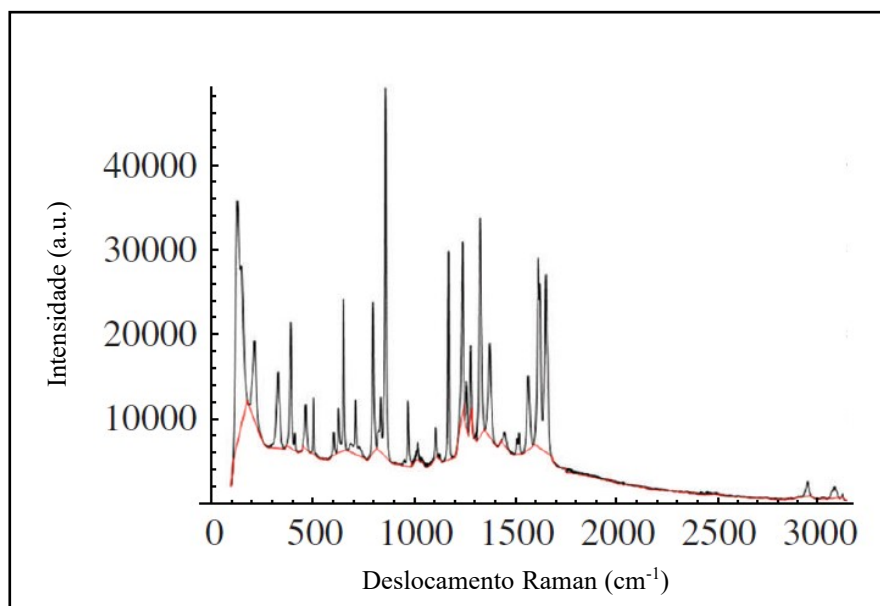


Figura 2.5. Espectro Raman característico do paracetamol. Adaptado de (Kourkoumelis, Polymeros & Tzaphlidou, 2012).

Relativamente às bandas espectrais características, incluem o Amido, representado numa faixa relevante em torno de 480 cm^{-1} que pode ser atribuída à vibração do anel.

As principais bandas do paracetamol estão de acordo com a literatura, tais como, 1649 cm^{-1} (C=O), 1612 a 1620 cm^{-1} (N-H), 1562 cm^{-1} (H-N-C=O), 1325 cm^{-1} (C-H) e 799 cm^{-1} (anel fenil). Verificam-se outros modos Raman na região espectral de 1166 a 1370 cm^{-1} devido a vibrações de deformação de C-H e N-H, respetivamente. Apresenta algumas bandas de alta intensidade em aproximadamente 840 cm^{-1} e de 1550 a 1670 cm^{-1} originárias de curvas de C-H fora do plano e de Amida I (C=O) e Amida II, respetivamente.

A maioria das drogas apresentam-se como formulações sólidas, comprimidos e cápsulas. Sabe-se que o estado de uma droga pode ter um impacto significativo na biodisponibilidade e estabilidade da mesma, portanto, a identificação e a caracterização das suas propriedades de formação de sal, formação de solvato, polimorfismo, e grau de cristalinidade tornam-se importantes no controle de qualidade. Salienta-se que as substâncias farmacêuticas se encontram sujeitas a alterações na composição e concentração químicas durante o processamento ou armazenamento da formulação.

Desta forma, a Espetroscopia de Raman tornou-se uma ferramenta extremamente importante no âmbito da identificação e análise do abuso de drogas quer legais quer ilegais. Em 2015, Penido *et al.* descobriram que a Espetroscopia NIR pode ser aplicada para distinguir entre as diversas formas de cocaína, tais como, pó de cloridrato de cocaína, cocaína crack, pasta Freebase e pó Freebase (Penido, Pacheco, Lednev & Jr., 2016).

Na **Figura 2.6**, encontra-se representado um espectro da análise da cocaína em diferentes formas.

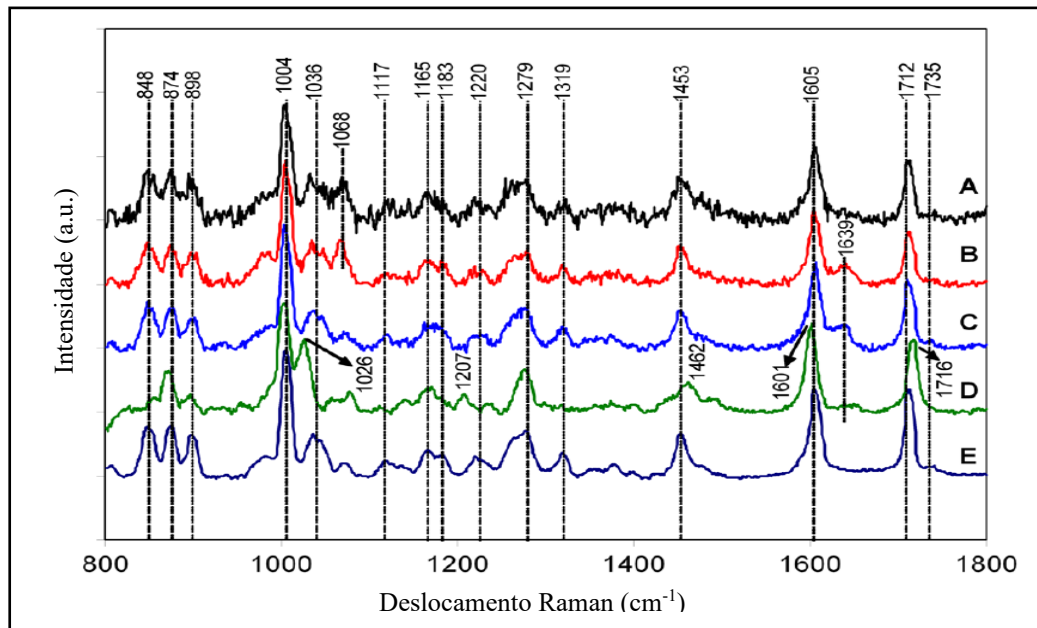


Figura 2.6. Espectros Raman de amostras de cocaína em diferentes formas: (A) pasta Freebase amarela, (B) pasta Freebase branca, (C) “crack rock”, (D) pó de cloridrato de cocaína, e (E) pó de cocaína Freebase. Adaptado de (Penido, Pacheco, Lednev & Jr., 2016).

A cocaína ocorre tipicamente em formas químicas Freebase e na forma cloridrato proveniente do Ácido Clorídrico (HCl), com a aparência física de “crack rocks” (Freebase), pasta (Freebase) ou pó (Freebase ou HCl). Quando as “freebase rocks” e a pasta geralmente são fumadas, os pós da Freebase e do HCl são tipicamente inalados. Além disso, a forma do HCl é utilizada igualmente para a injeção arterial/venosa porque é solúvel na água. Portanto, a identificação do tipo de cocaína é bastante importante na determinação do potencial de dependência, uma vez que influencia a dose consumida numa overdose. Adicionalmente, a rota do tráfico pode ser indicada pela forma da droga na altura da apreensão. Assim, a Espetroscopia de Raman foi avaliada como uma possível ferramenta para a identificação de cocaína em várias amostras que poderiam estar presentes numa cena de crime, como impressões digitais e pregos, bem como materiais que são comumente utilizados para esconder e transportar a droga, tais como, fibras têxteis embebidas (Penido, Pacheco, Lednev & Jr., 2016).

2.3.2. Área Oncológica

De acordo com a Globocan, no ano 2018, estimam-se cerca de 2,1 milhões de casos de cancro da mama feminino recém diagnosticados, a nível mundial, representando quase 1 em 4 casos de cancro entre as mulheres. Este tipo de cancro é o mais frequentemente diagnosticado na grande maioria dos países (154 de 185) sendo também considerada a principal causa de morte por cancro em mais de 100 países (Bray *et al.*, 2018).

O diagnóstico precoce do cancro é crucial para a implementação de tratamentos oportunos, eficazes e, em última instância, bem-sucedidos (Li *et al.*, 2015). Com os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, é possível afirmar que o cancro da mama não consiste numa doença uniforme, isto é, apresenta biológicas, taxas de crescimento e prognósticos muito diferentes em cada caso (B. *et al.*, 2016).

Pesquisas realizadas utilizando a Espectroscopia de Raman na análise de tecidos mamários normais e tecidos mamários cancerígenos referem que os espectros teciduais normais são atribuíveis a moléculas lipídicas, enquanto que os espectros de tecido cancerígeno são atribuíveis a moléculas proteicas (Li, Hao & Xu, 2017). Aquando da formação do tumor, ocorre a alteração da estrutura e da concentração das várias biomoléculas que constituem os tecidos e as células, tais como, os lípidos, os carboidratos, as proteínas e os ácidos nucleicos.

A **Figura 2.7** mostra um exemplo de análise espectral onde é possível observar as principais diferenças entre os espectros de tecido mamário normal e os espectros cancerígenos do tecido mamário (Li, Gao & Zhang, 2014).

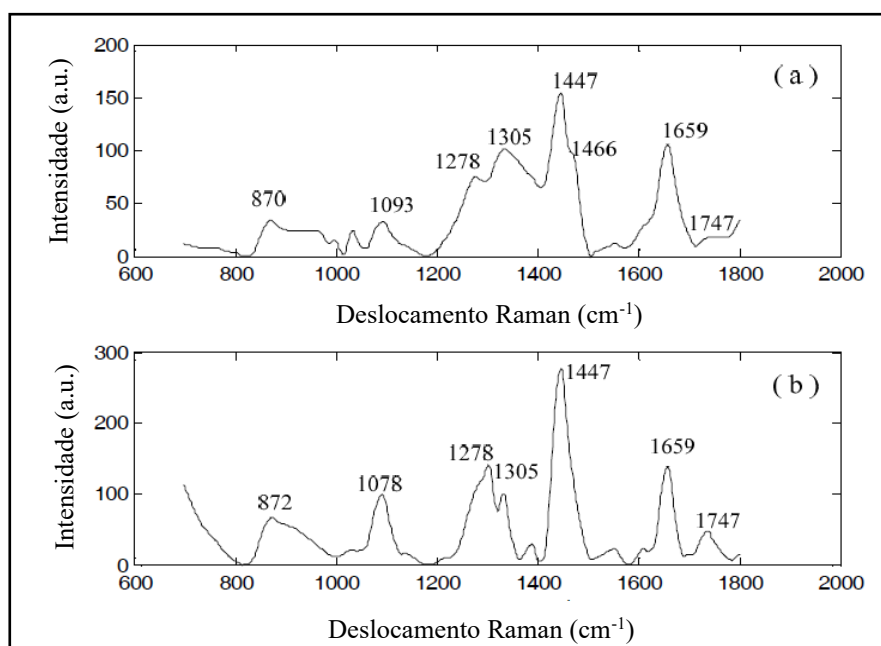


Figura 2.7. Espectro Raman (a) do tecido mamário cancerígeno após pré-processamento. (b) do tecido mamário normal após pré-processamento. Adaptado de (Li *et al.*, 2017).

Neste caso de estudo, para o tecido normal, as bandas características encontram-se em 872, 1078, 1305, 1447, 1659, 1747 cm^{-1} , enquanto que os picos presentes no tecido cancerígeno têm os valores de 870, 1093, 1278, 1305, 1447, 1659, 1747 cm^{-1} (Li *et al.*, 2017).

Os picos correspondentes aos comprimentos de onda de 870 e 872 cm^{-1} correspondem às moléculas de ácidos nucleicos, quer nos tecidos normais quer nos tecidos cancerígenos.

O pico em 1663 cm^{-1} representa a Amida I, uma das moléculas proteicas. O pico em 1278 cm^{-1} indica a presença de Amida III (estiramento C-N), e o pico em 1453 cm^{-1} indica a presença da deformação de CH_2 .

A posição do pico representado pelas moléculas de proteínas aparece em torno de 1278 cm^{-1} em tecidos cancerígenos e quase desaparece em tecidos normais. Além disso, o tecido normal mostra um pico de lípidos único proeminente em 1447 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} , onde as intensidades de pico em tecidos cancerígenos diminuem, obviamente, em comparação com 7 de 10 aqueles em tecidos normais (Li *et al.*, 2017).

Estas alterações nos diferentes tecidos indicam uma mudança, nomeadamente quantitativa, dos diferentes componentes celulares, tais como, proteínas, lípidos, e ácidos nucleicos, durante a formação do tumor, existindo assim uma maior proporção de proteínas em relação aos lípidos (Li *et al.*, 2014). A presença ou a falta de regiões espectrais, está relacionada com as diferenças na composição química entre as células e o tecido (Lee *et al.*, 2010).

Na **Tabela 2.1** encontra-se descrita a posição das bandas e as respetivas assinaturas moleculares inerente ao tecido mamário cancerígeno.

Tabela 2.1. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário cancerígeno. (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

Posição da banda (cm^{-1})	Assinatura molecular
815 – 827	O-P-O (ácidos nucleicos)
1078	Estiramento C-C ou C-O (lípidos)
1243 – 1278	Amida III (estiramento C-N) (proteínas)
1305 – 1308	Amida III, α -hélice, estiramento C-C e C-H (proteínas)
1447	Modo “scissoring” do metileno CH_2 (lípidos)
1453	Deformação de CH_2 (proteínas)
1653	Lípidos
1663	Amida I (Estiramento C=O) (proteínas)
1747 – 1750	Estiramento C=O (lípidos)

3. Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizadas amostras de duas naturezas distintas, farmacêuticas e orgânicas.

3.1. Caracterização das amostras

3.1.1. Amostras farmacêuticas

As amostras farmacêuticas estudadas pertencem ao grupo dos analgésicos. Dentro de cada tipo farmacêutico, nomeadamente, Ben-u-ron, aspirina e paracetamol líquido, foram analisadas amostras distintas. Os diversos medicamentos em estudo foram obtidos numa farmácia localizada na cidade da Maia. As aspirinas analisadas, foram a aspirina Gastrorresistente (GR) e o ácido acetilsalicílico Pharmakern, cada um contendo 100mg de substância ativa (ácido acetilsalicílico). Foi feita uma comparação entre ambos e com o ácido acetilsalicílico no estado puro, também medido. A **Tabela 3.1** representa a constituição de cada aspirina estudada.

Tabela 3.1. Composição da aspirina GR e do ácido acetilsalicílico Pharmakern.

Aspirina GR	Ácido acetilsalicílico Pharmakern
Celulose em pó	Celulose microcristalina (Núcleo)
Amido de milho	Amido de milho (Núcleo)
Copolímero de ácido metacrílico (Eudragit L 30D)	Copolímero de ácido metacrílico – etilacrilato (1:1) (Revestimento)
Laurissulfato de sódio	Laurissulfato de sódio
Polissorbato 80	Polissorbato 80
Talco	Talco
Citrato de trietilo	Citrato de trietilo

Relativamente ao Ben-u-ron, este foi analisado e comparado com o paracetamol Alter, ambos com 1000mg de substância ativa (paracetamol). Além disso, foi realizada uma comparação com o paracetamol no estado puro, previamente analisado. Na **Tabela 3.2** estão contempladas as composições de ambos os tipos de paracetamol.

Tabela 3.2. Composição do Ben-u-ron e do paracetamol Alter.

Ben-u-ron	Paracetamol Alter
Povidona	Povidona
Amido de milho	Amido de milho pré-gelatinizado sem glúten
Talco	Crospovidona
Ácido esteárico	Ácido esteárico
Sílica coloidal hidratada	Estearato de magnésio
Carboximetilamido sódico	Celulose microcristalina

Foi caso de estudo o paracetamol no estado líquido, um composto amplamente produzido pela indústria farmacêutica, devido aos seus efeitos analgésicos e antipiréticos suaves (Ellis, 2002).

O paracetamol líquido, contempla 10 amostras, contendo uma mistura de etanol com paracetamol. Além disso, foi analisada uma amostra de etanol para melhor compreensão dos espectros referentes ao paracetamol líquido.

Na **Tabela 3.3**, encontram-se representadas as amostras de paracetamol analisadas e a respectiva concentração.

Tabela 3.3. Caracterização das amostras de paracetamol.

Amostra	Concentração (g/Kg)
0	52.61
1	69.21
2	94.44
3	119.00
4	145.56
5	180.74
6	201.33
7	219.25
8	233.86
9	260.41

3.1.2. Amostras orgânicas

O objetivo deste estudo foi realizar testes às cegas (*blind tests*) de tecidos mamários com patologias malignas de modo a identificar por análise de Espectroscopia de Raman as bandas espectrais que indiquem possíveis alterações morfológicas correspondentes a estas patologias.

As amostras orgânicas analisadas correspondem a tecidos mamários provenientes de gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), nomeadamente fêmeas, e foram fornecidas pelo Hospital Veterinário da Universidade de Évora.

3.2. Instrumentação - Espectrómetro

A análise das várias amostras em estudo foi realizada no Laboratório do IFIMUP/IN da FCUP.

O espectrómetro utilizado neste estudo caracteriza-se pelo sistema mais avançado da Renishaw, considerado tecnologia de ponta o espectrómetro confocal Raman InVia™ Qontor® (**Figura 3.1**) apresenta uma elevada eficiência com distância focal de 250 mm, um rendimento superior a 30%, um detetor, dispositivo de carga acoplada (CCD) de 1024x256 pixéis com elevada sensibilidade na gama espectral entre 200 a 1064 nm arrefecido por efeito Peltier a -70 °C, com resolução espectral melhor que 2 cm⁻¹ para os diferentes comprimentos de onda de excitação 785, 633 e 532 nm.

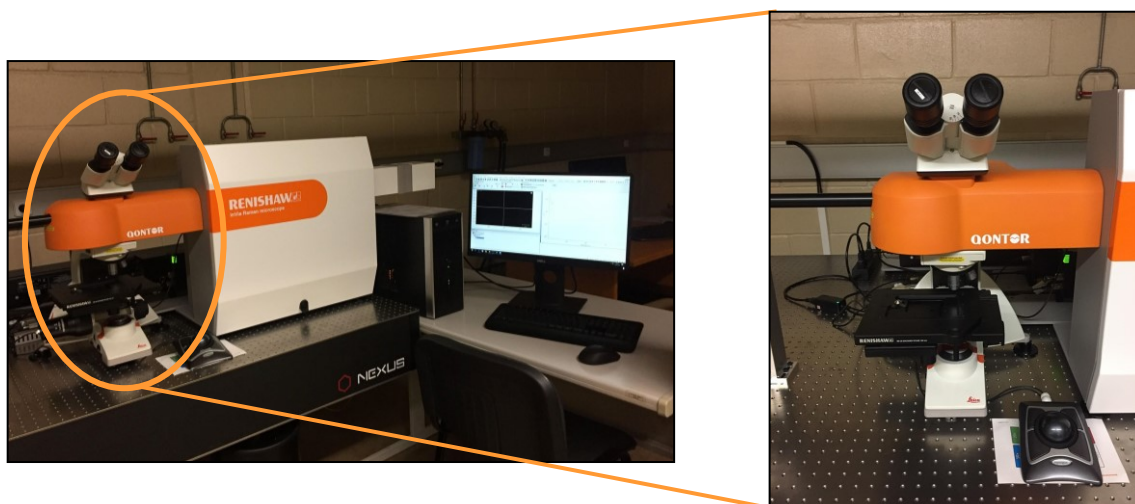


Figura 3.1. Espectrómetro confocal Raman InVia™ Qontor® com microscópio integrado presente no laboratório do IFIMUP/IN.

Inclui filtros de rejeição Rayleigh tipo “edge” para os lasers 532, 633 e 785 nm (**Figura 3.2**) com gama espectral de 100-4000 cm⁻¹ e filtro de rejeição Rayleigh Eclipse para o laser verde que permite medidas Raman Stokes e Anti-Stokes até 10 cm⁻¹.

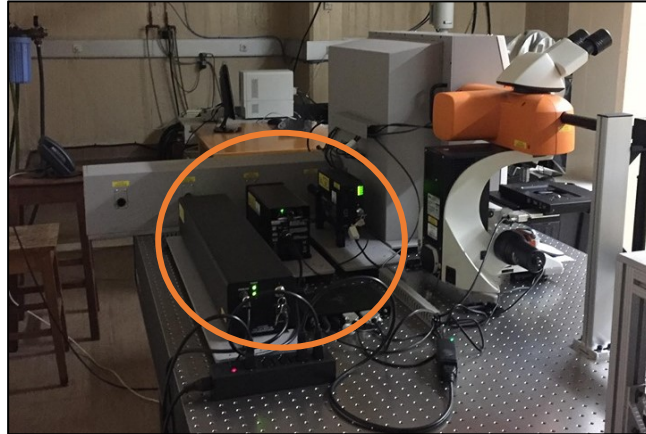


Figura 3.2. Lasers utilizados de 532, 633 e 785 nm.

Apresenta uma tecnologia de rastreamento de foco LiveTrack™ o que permite a análise de amostras com superfícies irregulares, curvas ou rugosas. O foco ideal é mantido em tempo real durante a coleta de dados e a visualização de vídeo de luz branca. Isto elimina a necessidade de focagem manual, pré-digitalização ou preparação de amostras demorada.

A tecnologia de ponta do microscópio Raman confocal inVia Qontor reduz o tempo total de experimentação e facilita a análise até mesmo das amostras mais complexas.

O microscópio de grau de pesquisa integrado caracteriza-se por ser um sistema de alta sensibilidade, indicado para transmissão automática de software e recepção de comprimento de onda de excitação.

3.3. Calibração com padrão silício

Antes de iniciar os ensaios de Espetroscopia de Raman propriamente dito é realizada uma verificação da calibração do espectrômetro com uma amostra padrão de silício. A amostra é colocada na platina do microscópio e a sua superfície é focada com a objetiva de 50×, utiliza-se o laser de 633 nm com uma potência de 50%, sendo feita uma aquisição de 1s. O pico de deslocamento Raman do silício deve ser próximo de 521 cm^{-1} . Os valores observados são registados num formulário de controle desenvolvido para o efeito. Quando necessário, é realizada uma calibração do espectrômetro conforme o manual do equipamento. A **Figura 3.3** representa um espectro de silício obtido durante uma verificação espectral realizada numa medição, através da calibração.

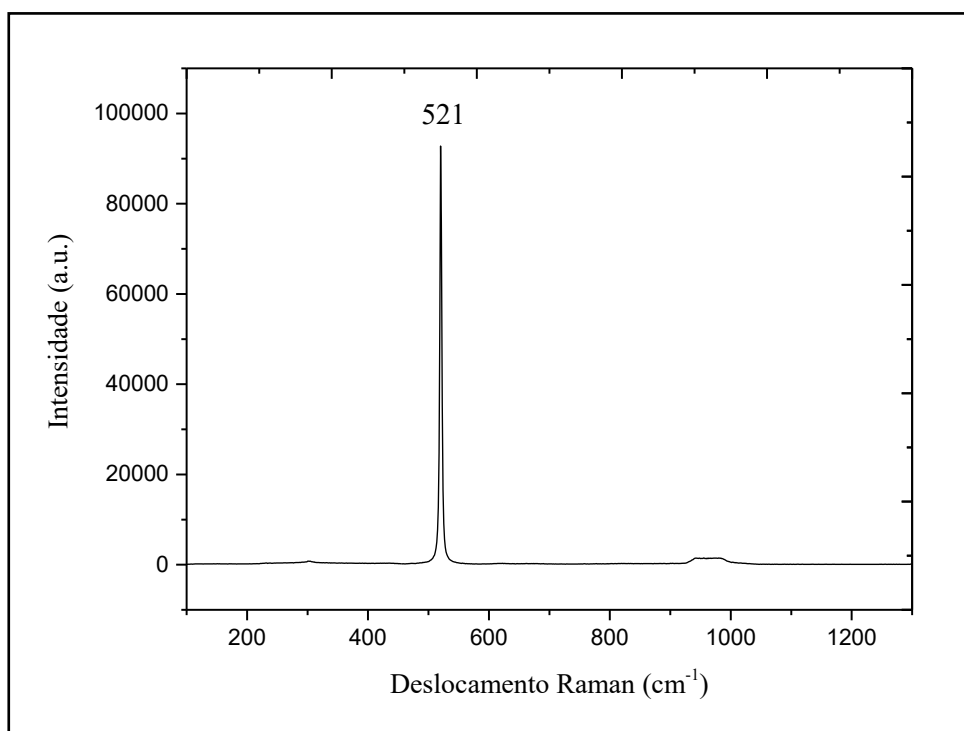


Figura 3.3. Espectro de calibração obtido por medição do silício numa das análises realizadas.

3.4. Preparação da amostra

A necessidade de preparação prévia da amostra depende muito da sua natureza físico-química. Como o método de introdução da amostra no equipamento é através do microscópio acoplado, é necessário que a amostra tenha um tamanho adequado para a sua colocação no microscópio e assim, que seja visivelmente plana de modo a facilitar o foco na superfície da mesma.

De um modo geral, as amostras não requerem preparações prévias elaboradas para a realização do ensaio espectroscópico.

Relativamente às amostras farmacêuticas, previamente os diferentes comprimidos foram reduzidos a pó através de um almofariz e um pilão. Apenas uma pequena quantidade de pó foi colocada na lâmina evitando que este se sobrepusesse e conseqüentemente formasse camadas.

As amostras líquidas, mais concretamente o paracetamol líquido foi colocado numa cuvete de vidro antes de ser colocado na platina do microscópio. Contudo, os líquidos também podem ser gotejados sobre uma lâmina de vidro.

No caso das amostras orgânicas, estas apenas eram retiradas do formol onde se encontravam e em alguns casos, era feito um corte de uma parte do tecido antes de colocar numa lâmina de vidro.

3.5. Procedimento de análise de amostras

O processo de análise das amostras tem início na aquisição e conhecimento ou não dos parâmetros das mesmas.

Previamente a cada dia de utilização, é verificada a calibração do equipamento através da mediação de uma amostra padrão de silício cujo sinal Raman é superior ao sinal Rayleigh.

Após esta etapa, procede-se à preparação das amostras em estudo quando necessário. Conforme a natureza das amostras, estas são colocadas sob lâminas ou cuvetes apropriadas, sendo posicionadas na platina do microscópio, onde são adequados os parâmetros do ensaio (parte mais crítica de todo o procedimento devido à natureza que cada amostra apresenta).

De seguida, foca-se a região a ser estudada e faz-se incidir a luz do laser na amostra. A luz é retro-espalhada, sendo enviada para o espectrómetro. O sistema envia o sinal para o computador que apresenta o espectro através do seu software, sendo este correspondente ao sinal de Stokes.

O sistema também permite fazer imagens das diferentes regiões do espectro Raman. Este processo permite visualizar outras linhas que não foram detetadas no ensaio inicial. Para isto ilumina-se a amostra com a fonte de laser e seleciona-se outra zona que se pretenda estudar, obtendo-se o espectro Raman. Assim, é possível analisar as diferentes regiões a detetar obtendo diversos espectros. Foram analisadas várias regiões de cada amostra permitindo estudar quer a sua homogeneidade quer a sua heterogeneidade.

Além disso, o sistema permite ainda mapear regiões e obter imagens, as quais geram os seus próprios espectros Raman. O tempo de iluminação utilizado para mapear cada região foi adequado aos diferentes tipos de amostras. A lente utilizada foi de 50× e os feixes de excitação luminosa foram o laser de neodímio dopado granada de ítrio e alumínio (Nd:YAG) 532 nm, o laser de He-Ne, 633 nm, e o laser NIR de 785 nm.

É de salientar que todos os ensaios microscópicos foram realizados à temperatura ambiente (~20 °C).

3.6. Parâmetros de aquisição dos espectros Raman

Os parâmetros para a aquisição dos espectros são manuseados no software, procedendo-se à varredura do espectro. Os parâmetros contemplam os seguintes itens:

- **Nome do arquivo:** Nome do arquivo vinculado à amostra em estudo.
- **Potência do laser:** Potência de laser adequada à natureza da amostra, de modo a não destruir ou mesmo degradar a amostra.

- **Gama espectral:** Gama espectral utilizada, onde se encontra toda a informação relevante, adequada ao tipo de amostra em estudo.
- **Rede de difração:** Separação cromática das frequências. Conforme o tipo de laser a utilizar.
- **Tempo de exposição:** Tempo de varredura necessário para adquirir a informação relevante. Corresponde ao tempo onde a luz espectralmente dispersa emergindo do espectrómetro é permitida para golpear os pixéis da disposição do CCD e para acumular a carga.
- **Número de acumulações:** permite a redução de forma eficaz do ruído aleatório inerente no espectro Raman e está relacionado com o número de espectros acumulados.

Para uma melhor confiabilidade nos resultados obtidos, devem ser analisadas diversas amostras, sendo realizadas várias análises num mesmo ponto da amostra e também em várias regiões da mesma, sobretudo quando a amostra se revela muito heterogénea.

3.7. Processamento de dados

3.7.1. Interpretação do espectro

Após a aquisição dos espectros Raman das amostras, os mesmos são arquivados no computador com a extensão do próprio software e também são convertidos na extensão de arquivo .txt para posterior envio e utilização. A interpretação dos espectros Raman obtidos é feita num primeiro momento pelo perfil do espectro e presença de bandas Raman características de principais grupos funcionais. Para isso, são utilizadas tabelas, livros e artigos como referência para a interpretação dos resultados.

Apesar das inúmeras vantagens intrínsecas de especificidade molecular na identificação dos compostos, esta técnica espectroscópica apresenta as suas limitações devido a medições com imprecisões provenientes do ruído inerente aos espectros. Assim, os espectros Raman são constituídos por duas partes, o sinal de Raman e a parte do ruído. Neste contexto, o ruído corresponde à parte espectral que contém informações indesejadas, ou seja, que não estão relacionadas com a composição química da amostra. A qualidade de um espectro Raman, é determinada maioritariamente pela razão sinal-ruído (SNR), e é, portanto, importante para aumentar o sinal e reduzir o ruído, tanto quanto possível. As principais fontes de ruído encontram-se abaixo descritas (Zeña, Zângaro, Pacheco & Jr., 2014):

Ruídos gerados pelo equipamento: estes ruídos são dependentes das especificações da câmara CCD utilizada no espectrómetro. Entre eles, são considerados dois tipos de ruído: a

corrente escura (CE) e o **erro de leitura (EL)**. O EL surge da variação estatística do número dos elétrons que são gerados termicamente no interior da estrutura de silício da câmara CCD. Este ruído é determinado pela expressão

$$\sigma_e = \frac{\Phi_e t}{2} \quad (3.7.1.1)$$

onde Φ e corresponde à taxa de elétrons libertados pela temperatura e t corresponde ao tempo (s). Como este ruído depende da temperatura, pode ser reduzido por meio de arrefecimento da CCD. O EL é uma combinação de componentes de ruído do sistema decorrentes do processo de conversão dos transportadores de cargas geradas nos pixels da câmara CCD para um sinal de tensão e posterior conversão deste sinal de tensão analógico em um sinal digital. Identifica-se este ruído por σ_l .

Ruído quântico (RQ): é o ruído que ocorre devido à natureza quântica da luz. É definido como a taxa de elétrons gerados espontaneamente no detetor. Trata-se de um ruído aleatório, distinto para cada acumulação de aquisição. É inevitável na medida dos espectros. É um tipo de ruído presente em todas as aquisições em que haja sinal, independente da qualidade da câmara CCD. Duas medições espectrais consecutivas da mesma amostra mostram variações no que diz respeito ao número de fótons coletados em qualquer pixel. O nível de ruído é igual à raiz quadrada do número de fótons detetados. Quanto maior a quantidade de fótons detetados, (tempo de aquisição mais longo) maior a SNR nos espectros Raman.

Fluorescência: a amostra absorve completamente a luz e passa ao estado eletrônico excitado pela absorção de um fóton. Durante um período de tempo a amostra relaxa rapidamente e retorna ao mais baixo nível vibracional do primeiro estado excitado, reemitindo radiação. Este tipo de ruído pode ser um grande desafio, uma vez que, o sinal de fluorescência na maioria dos casos é muito elevado quando comparado com o sinal Raman, e, portanto, o sinal Raman pode ser mascarado pela fluorescência. As limitações provocadas pela fluorescência nem sempre são previsíveis e ocorrem frequentemente nas amostras não descritas tipicamente como fluorescentes.

Quando consideramos analisar uma amostra através de Espetroscopia de Raman, é útil entender previamente quais as condições que levam à fluorescência, e como esta pode ser minimizada. Uma forma de reduzir a fluorescência é utilizar o comprimento de onda mais longo da excitação. Aplicando um comprimento de onda mais longo da excitação a fração do material comum que pode absorver a luz e criar um estado eletrônico excitado irá diminuir. Além disso,

iluminando a amostra com luz laser um período de tempo prévio à aquisição de dados pode, por vezes, reduzir o fundo de fluorescência, devido à destruição de material fluorescente. Finalmente, existem métodos de pré-processamento espectrais que podem ser aplicados para remover ou reduzir o fundo de fluorescência.

Ruído gerado por fontes externas: de um modo geral, é causado por fontes de luz externas que contribuem para a contaminação do sinal. Assim, consistem em ruídos que não são gerados pelo sinal da amostra e nem pelo instrumento (CCD). A fonte principal deste ruído são as descargas que chegam à Terra, que ao incidirem na CCD, libertam um grande número de elétrons que são indistinguíveis aos fótons-elétrons provenientes da amostra. Estas descargas geram bandas muito estreitas e de alta intensidade em posições aleatórias do espectro Raman. É possível realizar uma filtragem que geralmente é aplicada para eliminar o efeito das descargas. A luz solar e uma gama de outras fontes claras contribuem para o aparecimento das faixas estreitas similares no espectro. Assim, as medições feitas por Espetroscopia de Raman devem ser realizadas no escuro. E, finalmente, qualquer sinal Raman é mascarado por forte radiação de corpo negro que é definido como a radiação que todos os objetos emitem quando a sua temperatura está acima do zero absoluto.

A **Figura 3.4** apresenta um espectro Raman de óleo mineral, ilustrando os principais tipos de ruídos.

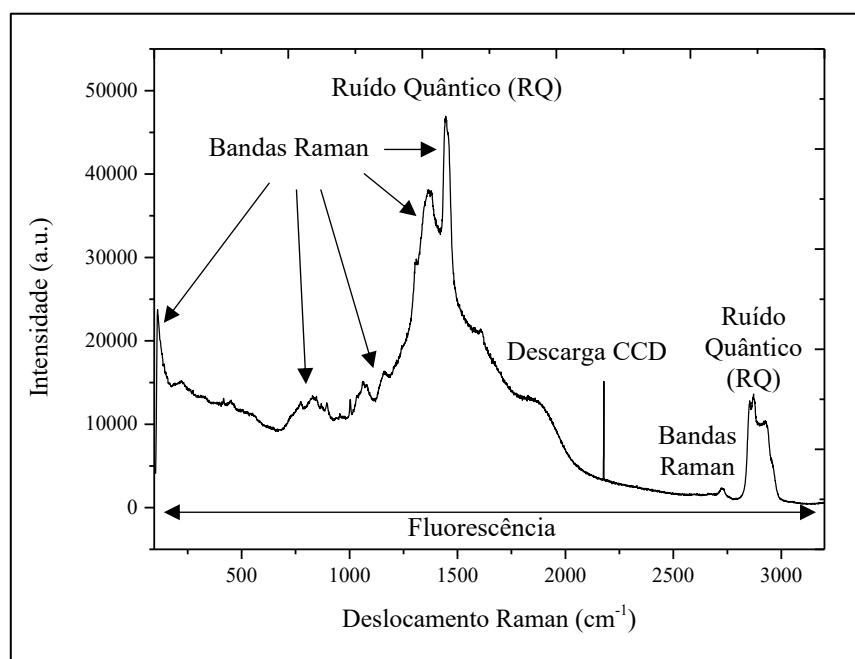


Figura 3.4. Ruídos típicos de um espectro Raman obtido de óleo mineral. Adaptado de (Zeña *et al.*, 2014).

4. Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados referentes às análises realizadas como descrito no capítulo anterior desta dissertação. Os resultados encontram-se divididos em duas partes: a primeira corresponde a uma análise comparativa de amostras farmacêuticas, as sólidas, aspirinas e Ben-u-ron, tendo como base dois laboratórios distintos para cada tipo farmacêutico, bem como uma análise de cada composto ativo, ácido acetilsalicílico e paracetamol. Relativamente às amostras líquidas, são descritos os resultados sobre a análise de diferentes concentrações de paracetamol líquido.

A segunda parte, surge no âmbito oncológico, onde são apresentados resultados inerentes à análise de amostras do tecido mamário de uma espécie *Felis catus domesticus*.

Neste capítulo, o objetivo geral é verificar a confiabilidade e sensibilidade da técnica. Assim, com as amostras farmacêuticas, pretende-se que esta técnica espectroscópica detete as diferentes variações de excipiente presentes nos comprimidos dos diferentes laboratórios. Além disso, com a medição do paracetamol líquido, pretende-se demonstrar que a técnica é boa para medir diferentes concentrações.

Relativamente às amostras de tecido orgânico, pretende-se encontrar diferenças espectrais potencialmente indicadoras de patologia, nomeadamente neoplasia, contribuindo para um estudo preliminar do comportamento do cancro no tecido mamário, sendo este um campo ainda pouco estudado.

4.1. Amostras farmacêuticas

Neste âmbito, foram analisadas por Espectroscopia de Raman as várias amostras de interesse. Para isso, o espectrómetro confocal Raman InVia™ Qontor®, foi utilizado com uma fonte de excitação de laser de 633 nm, com o microscópio acoplado na objetiva de 50×.

É de salientar que previamente a cada medição foi feita a verificação da calibração do espectrómetro Raman, utilizando-se uma amostra de silício até ao ajuste da intensidade de Raman característica para 521 cm^{-1} , garantindo uma melhor confiabilidade das medições.

Foram analisadas três amostras de cada grupo farmacêutico, uma delas correspondente ao composto ativo de cada grupo no estado puro, sendo as restantes atribuídas a diferentes laboratórios. Todas as amostras foram analisadas em forma de pó.

Para cada amostra, foram obtidos cerca de 20 espectros, sendo esta analisada num mesmo ponto e em diferentes regiões. A aquisição foi realizada na gama espectral de 200 a 3500 cm^{-1}

com o laser He-Ne, correspondente a 633 nm, uma potência de 50% e com um tempo de aquisição de 10s.

4.1.1. Aspirina

A **Figura 4.1**, contém apenas uma amostragem das 20 realizadas, de cada amostra e mostra comparativamente os espectros de cada tipo laboratorial avaliada em relação à substância ativa.

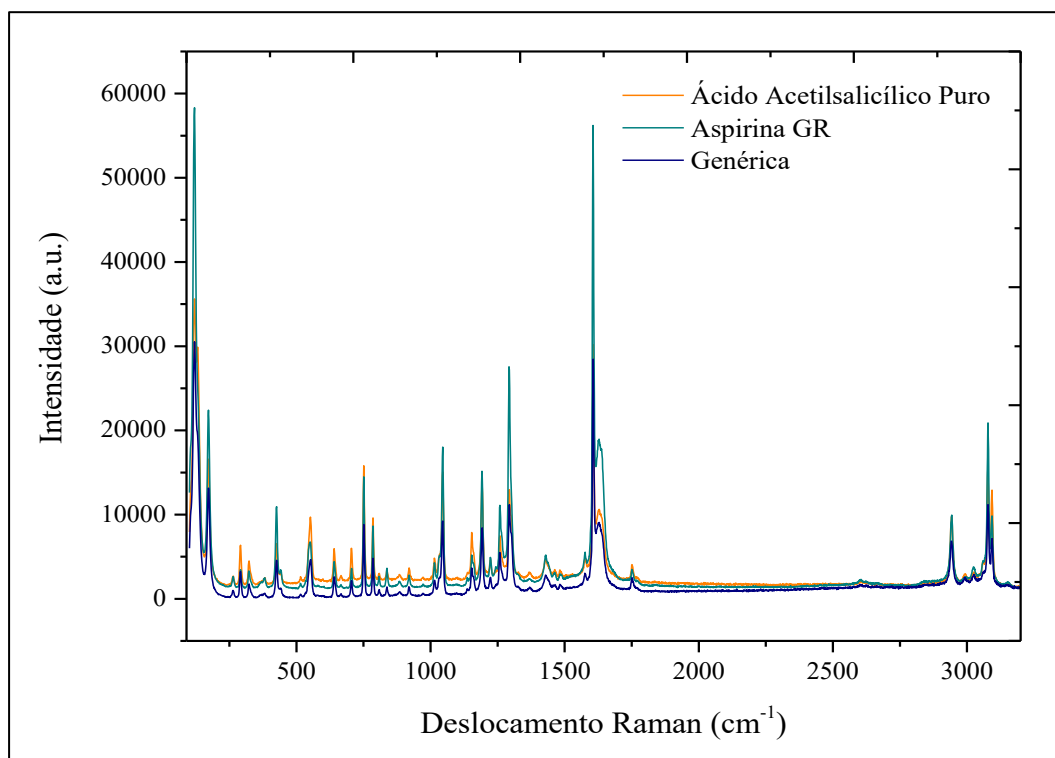


Figura 4.1. Espectro Raman obtido através da análise comparativa das diferentes aspirinas e da substância ativa no estado puro.

Observa-se especificamente que as aspirinas são muito semelhantes entre si e semelhantes em relação à substância ativa. É de referir que as aspirinas apesar de diferirem na sua constituição, revelam uma homogeneidade no que diz respeito ao composto ativo. Esta pode dever-se à alta concentração dos excipientes e também a uma distribuição uniforme da substância ativa. Isso comprova o potencial da Espetroscopia de Raman na determinação da distribuição de ingredientes ativos e na composição de diferentes comprimidos para controle de qualidade durante e após a produção.

4.1.2. Ben-u-ron

A **Figura 4.2** mostra comparativamente os espectros de cada amostra laboratorial avaliada em relação à substância ativa.

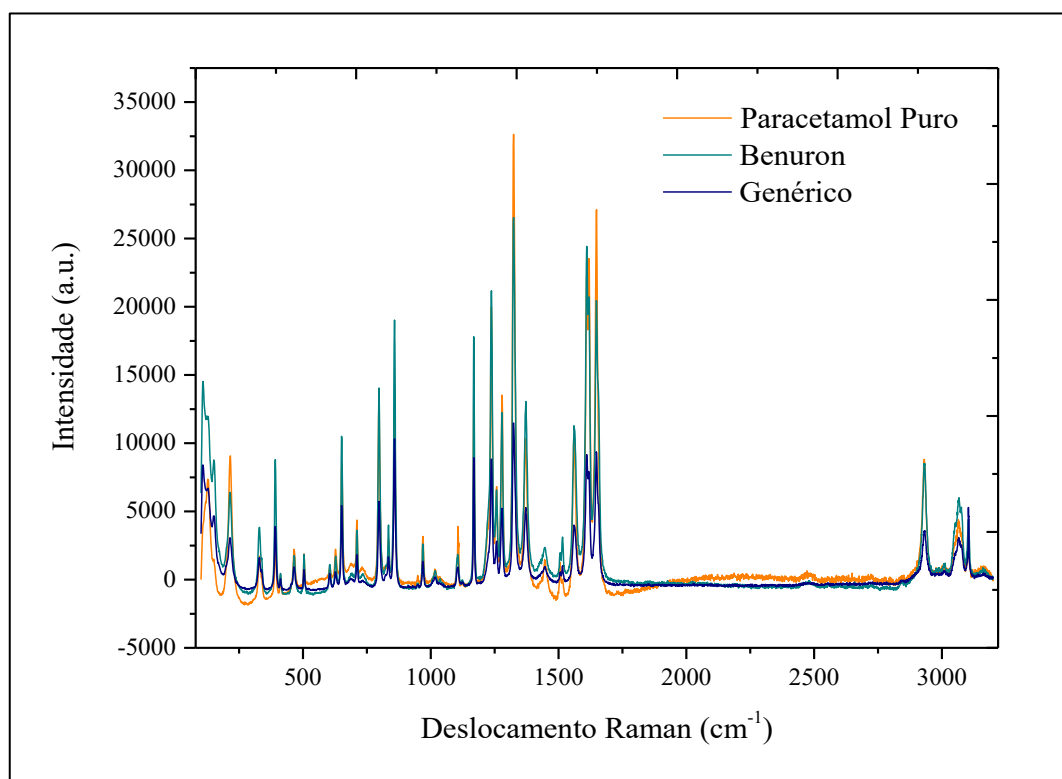


Figura 4.2. Espectro Raman obtido através da análise comparativa dos diferentes laboratórios de paracetamol e também no estado puro.

Neste estudo foi possível comparar os espectros Raman obtidos dos diferentes tipos de paracetamol analisados. É importante salientar que nestas análises foram utilizados os comprimidos conforme produzidos, apenas reduzidos a pó, sem nenhuma alteração, o que justificaria eventuais diferenças entre espectros obtidos da literatura do paracetamol puro.

Os espectros encontram-se muito próximos, mostram pequenas discrepâncias de intensidade dos picos e de deslocamentos devido ao fenómeno da fluorescência. Constatou-se a presença da substância ativa em ambos, com uma distribuição praticamente uniforme.

Assim, é possível demonstrar a potencialidade da Espectroscopia de Raman nas determinações qualitativas.

Por outro lado, um primeiro procedimento realizado foi que, para cada grupo de espectros obtidos para cada amostra, foram analisados, em média e comparados entre cada laboratório, incluindo a substância ativa, como mostram as **Figuras 4.1** e **4.2**. O processamento de dados, nomeadamente a subtração do fundo de fluorescência, a remoção das descargas e a

normalização dos espectros foi realizado sempre que necessário utilizando o software gráfico para análise de dados e estatística.

Em algumas amostragens, foi necessário subtrair a linha de base, devido ao elevado *background*.

4.1.3. Paracetamol líquido

Nesta parte do estudo, inicialmente foi analisada uma amostra de etanol, sendo posteriormente analisadas 10 amostras de paracetamol líquido com diferentes concentrações. Para esta análise utilizou-se o laser He-Ne, 633 nm, com uma potência correspondente a 50%. Cada espectro foi adquirido em 10s.

O estudo prévio do etanol teve como papel auxiliar a compreensão da análise das amostras de paracetamol líquido em estudo, uma vez que estas contêm concentrações crescentes do mesmo. Desta forma, o estudo do etanol contribuiu para uma análise mais fundamentada do paracetamol na forma líquida.

Na **Figura 4.3**, observa-se o espectro de Raman analisado com as bandas características do etanol.

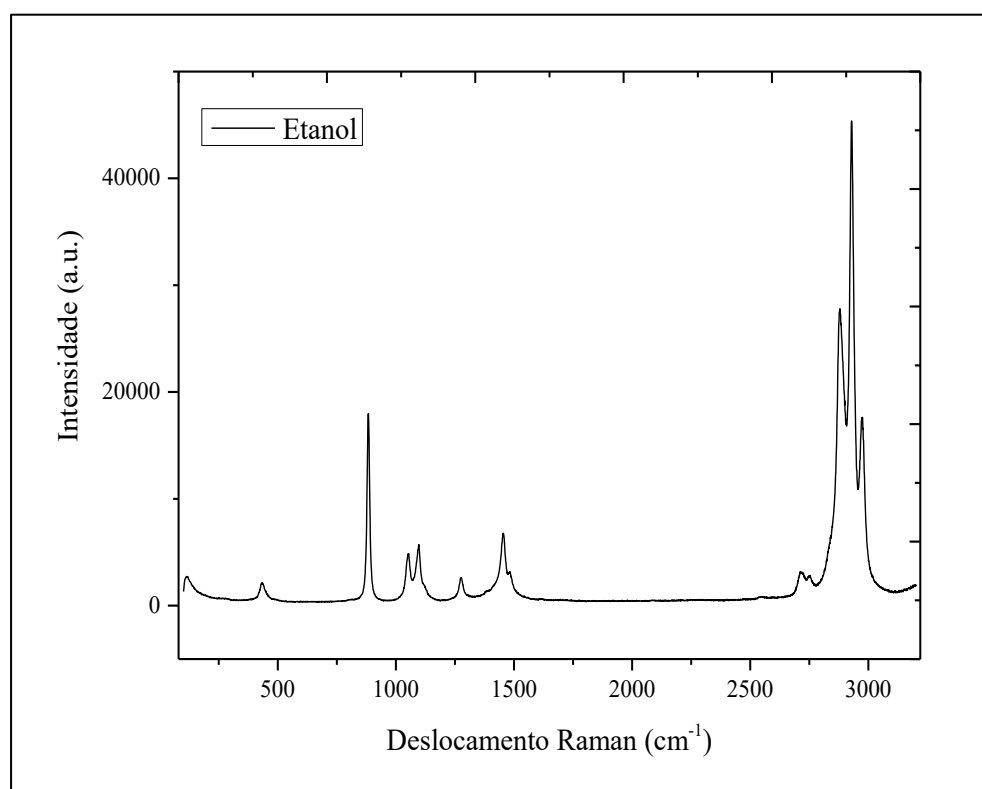


Figura 4.3. Espectro Raman correspondente à análise do etanol.

Na **Figura 4.4**, observam-se bandas espectrais indicadoras da presença do etanol.

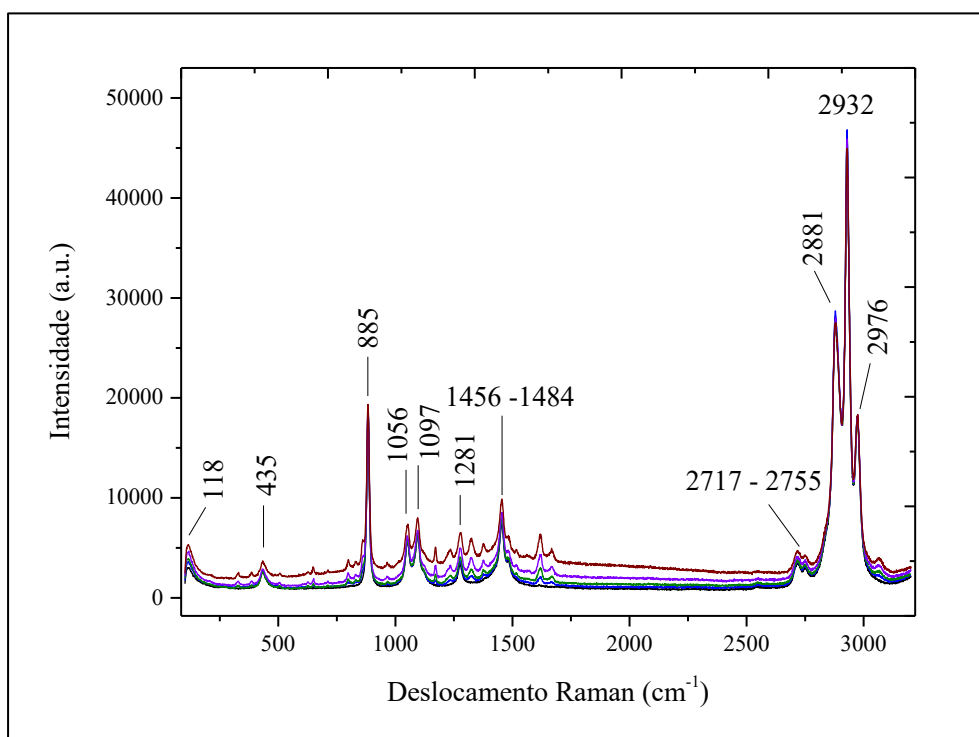


Figura 4.4. Espectro Raman das amostras 0 a 4 (Tabela 3.3) do paracetamol líquido, indicando as bandas indicadoras da presença de etanol.

No entanto, há regiões espectrais onde surgem bandas que, no mínimo de concentração de paracetamol (52,61 g/Kg), não são visíveis, como é possível verificar através da análise da **Figura 4.5**.

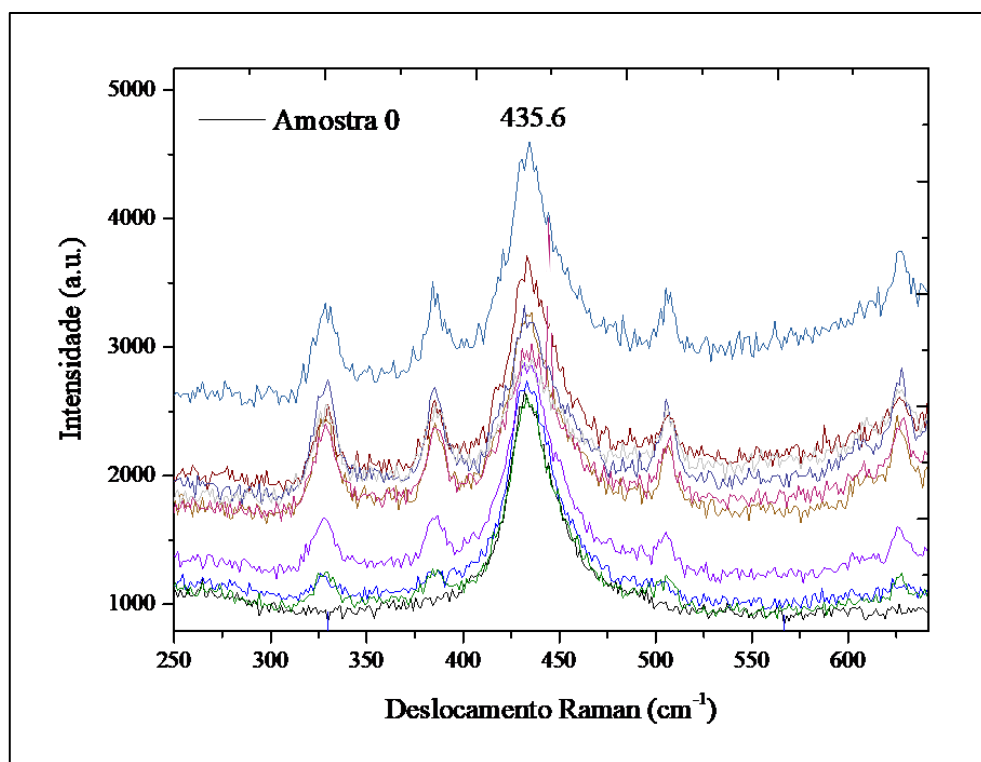


Figura 4.5. Espectro Raman do estudo do paracetamol líquido demonstrando o aparecimento de bandas da amostra 0 (mínimo de concentração) para as restantes amostras (1-9), com indicação do pico do etanol a 435.6.

Além disso, foram analisadas diversas bandas, nomeadamente a 328.5, 385.4 e 506.5 cm^{-1} , onde se verificou que a área integrada aumenta com a concentração de paracetamol (**Figura 4.6**).

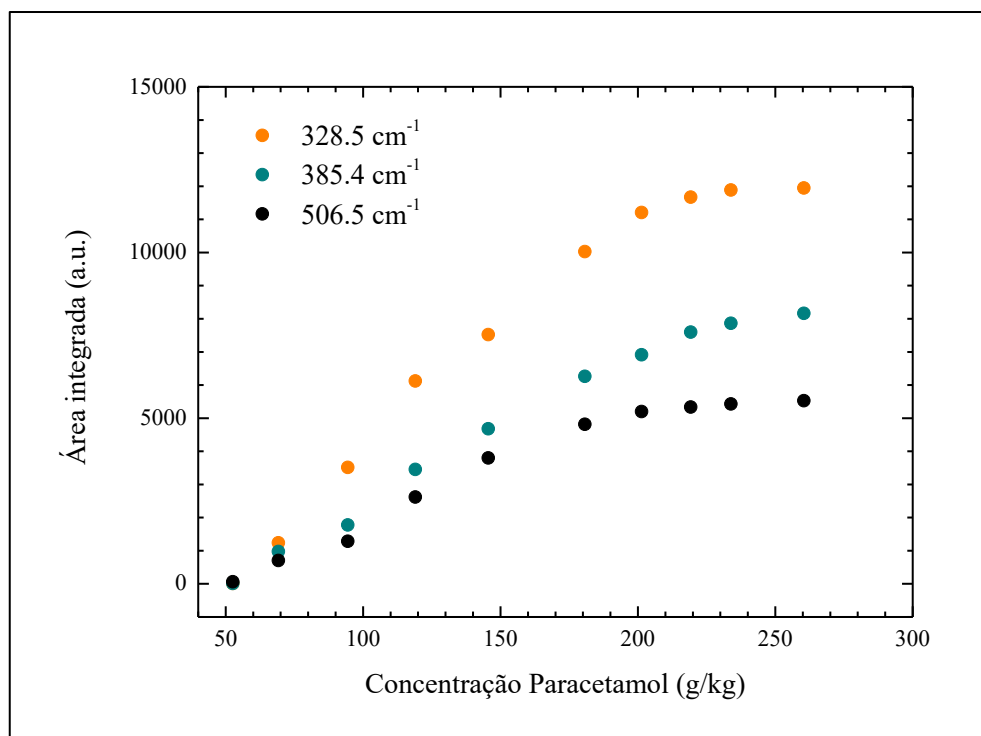


Figura 4.6. Relação da área em função da concentração das bandas 328.5, 385.4 e 506.5 cm^{-1} da análise do paracetamol líquido.

A sensibilidade deste método de análise foi determinada na gama de concentrações entre 50 e 180 g/kg onde é possível observar um comportamento linear. Para as bandas 328.5, 385.4 e 506.5 cm^{-1} , foram obtidas as sensibilidades correspondentes de 79.6 $\text{m}^2/(\text{g/kg})$, 49.1 $\text{m}^2/(\text{g/kg})$ e 38.4 $\text{m}^2/(\text{g/kg})$, respetivamente. Acima dos 180 g/kg, o comportamento não linear observado advém da aproximação à saturação da concentração de paracetamol. Desta forma, verificou-se que a sensibilidade diminui para regiões espectrais mais altas, sendo que este comportamento ainda se encontra a ser alvo de estudo.

A **Figura 4.7** apresenta o resultado da análise do pico de etanol correspondente a 435.6 cm^{-1} .

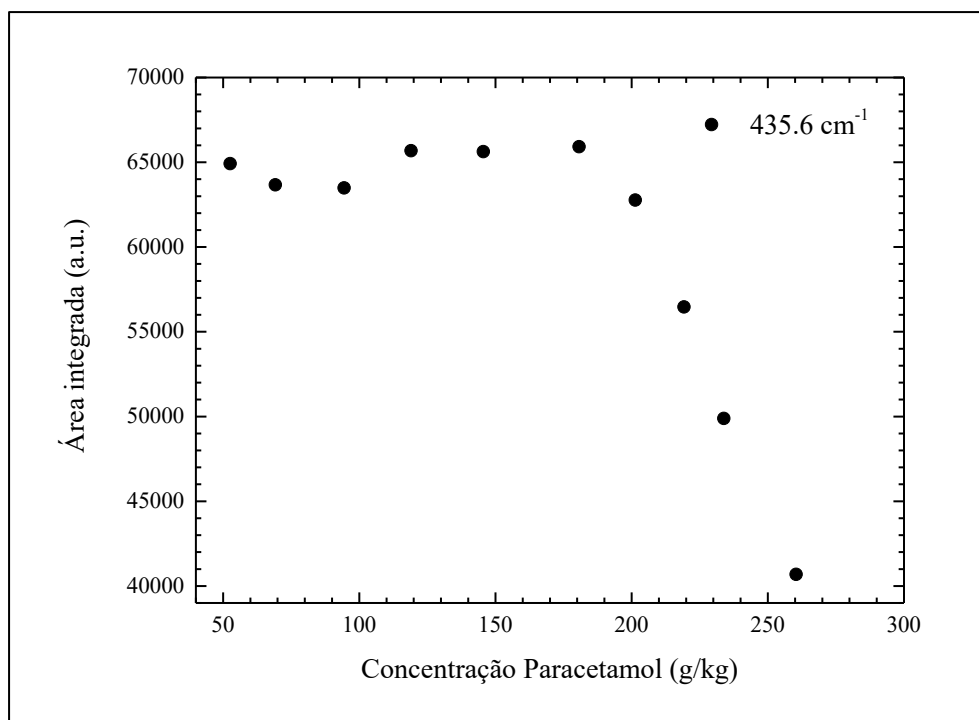


Figura 4.7. Relação da área em função da concentração da banda a 435.6 cm^{-1} do etanol.

Neste caso, por análise do pico de etanol (435.6 cm^{-1}), é possível observar que esta banda apresenta um comportamento aproximadamente constante até atingir os 180g/kg , valor a partir do qual as amostras apresentam altas concentrações de paracetamol e desta forma se aproximam da saturação. A partir deste valor de concentração, o etanol diminui significativamente, o que seria esperado.

4.2. Amostras orgânicas

Esta segunda parte do estudo contempla a análise das amostras orgânicas de tecido mamário inerente ao *Felis catus domesticus*, apresentando as diferentes comparações de regiões distintas quer da mesma amostra, quer de amostras diferentes.

Foram estudadas 10 amostras, sem qualquer tipo de conhecimento histopatológico, ou seja, foram realizados testes às cegas (*blind tests*) de modo a identificar alterações morfológicas que indicassem possíveis neoplasias - tumores malignos.

É de salientar que o tecido mamário identificado na região do infravermelho é essencialmente o epitélio ductal, tecido conjuntivo e tecido adiposo, estando designados a estes tecidos grupos funcionais de proteínas, lípidos, Amidas, ácidos nucleicos e aminoácidos, todos representativos do tecido mamário (Fabian *et al.*, 2006). Portanto, contribuições de todas essas biomoléculas são esperadas em diferentes graus na região espectral. As regiões específicas para

estas moléculas podem ser encontradas numa dada região espectral através de bandas específicas, incluindo os lípidos ($3100 - 2680 \text{ cm}^{-1}$), Amida I ($1800-1510 \text{ cm}^{-1}$), Amida II ($1510-1390 \text{ cm}^{-1}$), Amida III ($1390-1440 \text{ cm}^{-1}$), aminoácidos e ácidos nucleicos ($980-600 \text{ cm}^{-1}$) (Brozek-Pluska *et al.*, 2012; Lazaro-Pacheco, Shaaban, Rehman & Ihteshamur, 2019; Chao, *et al.*, 2017).

Foram feitas várias amostragens de cada amostra, sendo que na mesma amostra também se realizaram várias medições. Após a análise das várias amostras, constatou-se que apresentam espectros de Raman com bandas características apresentadas na literatura (Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019) representativas quer de tecidos mamários normais, quer de tecidos com possíveis lesões ou neoplasias.

A **Figura 4.8** mostra (a) as imagens microscópicas das regiões analisadas, correspondentes às amostras 1 e 2; (b) e a respectiva análise espectral.

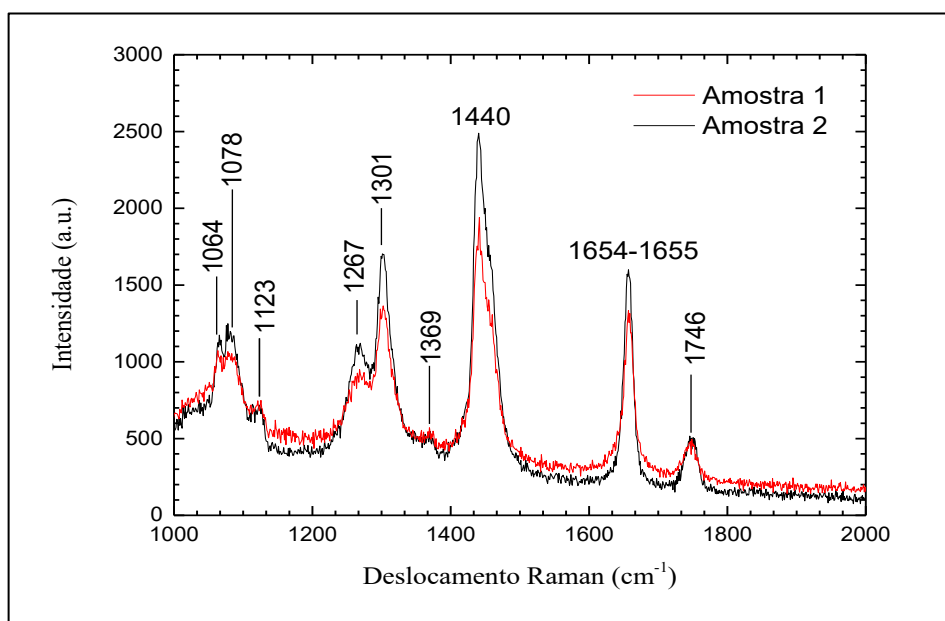
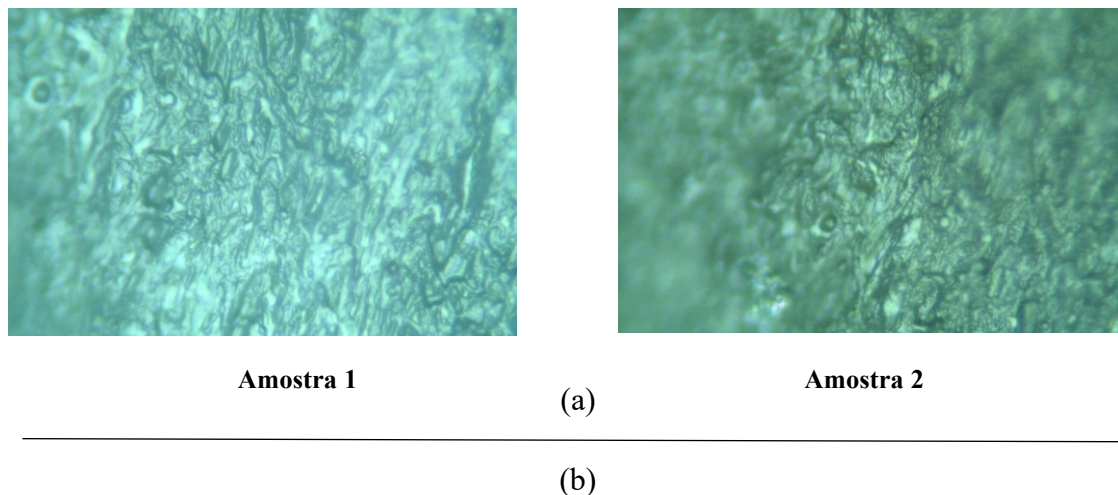


Figura 4.8. (a) Imagens microscópicas das regiões analisadas, correspondentes às amostras 1 e 2; (b) e a respectiva análise espectral.

Numa primeira análise comparativa, é claramente demonstrada a repetibilidade do processo para diferentes amostras. Por outro lado, existem várias bandas bem definidas, nomeadamente a 1064, 1078, 1123, 1267, 1301, 1369, 1440, 1654-1655 e 1746 cm^{-1} , que correspondem ao espectro de Raman identificador de um tecido mamário normal, isto é, sem qualquer alteração morfológica (Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019).

A **Tabela 4.1** apresenta a identificação de cada uma das bandas observadas no espectro de Raman, correspondente às amostras 1 e 2 analisadas, estando em conformidade com os resultados encontrados na literatura (Fabian *et al.*, 2006; Brozek-Pluska *et al.*, 2012; Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019).

Tabela 4.1. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário (Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019).

Posição da banda (cm^{-1})	Assinatura molecular
1064	Estiramento C-C (lípidos)
1078	Estiramento C-C ou C-O (lípidos)
1123	Estiramento C-C (lípidos)/ Estiramento C-N (proteína)/glucose
1267	Amida III (estiramento C-N) (proteínas)
1301	Deformação C-H (CH_2) (lípidos)
1369	TRP (proteínas), guanina, lípidos, porfirinas
1440	Modo vibracionais dos lípidos
1654-1655	Amida I (estiramento C=O de proteínas), Estiramento C-C (lípidos)
1746	Modos vibracionais de lípidos

Durante o processo de análise das várias amostras de tecido mamário, também é de salientar que foram observados espectros com bandas indicadoras de tecidos com possíveis lesões ou neoplasias. A **Figura 4.9** mostra (a) a imagem microscópica da região analisada, correspondente à amostra 3; (b) e a respetiva análise espectral.



Amostra 3

(a)

(b)

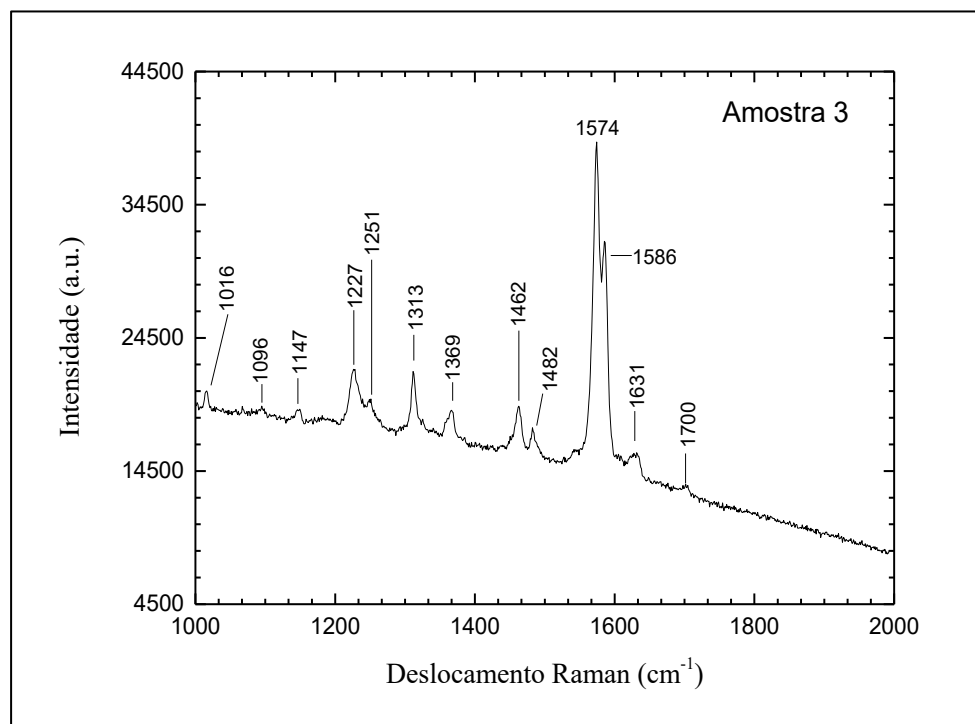


Figura 4.9. (a) Imagem microscópica da região analisada, correspondente à amostra 3; (b) e a respectiva análise espectral.

Neste caso, observa-se que as bandas espectrais da amostra 3 são distintas das bandas encontradas para as amostras 1 e 2, identificadas como tecido normal. É possível identificar bandas bem definidas a 1016, 1096, 1147, 1227, 1251, 1313, 1369, 1462, 1482, 1574, 1586, 1631 e 1700 cm⁻¹. No entanto, apenas algumas bandas espectrais relevantes foram encontradas na literatura, conforme é apresentado na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2. Posição das bandas e assinaturas moleculares do tecido mamário (Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019).

Posição da banda (cm⁻¹)	Assinatura molecular
1096	Estiramento O-P-O simétrico (fosfato II)
1227	Amida III: β -sheet
1251	Amida III/adenina/citosina
1313	Modo “twist” CH ₃ CH ₂ (colagénio/lípidos)
1369	TRP (proteínas), guanina, lípidos, porfirinas
1462	Estiramento C-O simétrico. Calcium oxalate dihydrate - Calcificação Tipo I
1482	Ácidos nucleicos (guanina e adenina)
1574-1586	Anel de pirimidina (Ácidos nucleicos) e proteína heme
1631	Estiramento C-O simétrico. Calcium oxalate dihydrate - Calcificação Tipo I

Na análise destes resultados, é de salientar que as bandas 1462 e 1631 cm⁻¹ apresentam calcificações, sendo potencialmente indicadores de tecidos com lesões. As bandas espectrais a 1369, 1482, 1574 e 1586 cm⁻¹ estão relacionadas com ácidos nucleicos – estes são biomoléculas do controlo celular, pois contêm a informação genética (ADN). É também conhecido na literatura (Brozek-Pluska *et al.*, 2012; Lazaro-Pacheco *et al.*, 2019; Surmacki, Musial, Kordek & Abramczyk, 2013) que as células tumorais indicam uma maior contribuição nas bandas espectrais correspondentes às proteínas, com maior relevância nas bandas associadas ao ADN. Para finalizar, a amostra 3 apresenta elevada fluorescência, comportamento típico dos espectros de Raman indicadores de tecidos com lesões ou neoplasias.

5. Conclusões e Trabalhos Futuros

Este trabalho de investigação tinha como principal objetivo sobretudo o conhecimento e aprendizagem de um equipamento inovador de Espetroscopia de Raman em Portugal.

O espectrómetro de Raman foi utilizado como ferramenta de análise de diversas amostras, com o intuito de numa primeira fase perceber a sensibilidade da técnica, e a capacidade de a mesma medir diferentes concentrações, sendo que com a análise dos tecidos orgânicos, o foco era a determinação de alterações morfológicas como possíveis indicadores de neoplasia maligna.

Os espectros Raman fornecem bastante informação no que respeita à constituição bioquímica da amostra em estudo, onde é possível obter-se uma gama de bandas características da mesma. Com recurso a ferramentas de análise de dados, é possível aprimorar os resultados adquiridos e obter os espectros Raman de forma a estar em conformidade para serem interpretados.

Desta forma, esta técnica espectroscópica não destrutiva, revela-se ser uma técnica poderosa, com a principal vantagem de não exigir uma preparação prévia das amostras. Além disso, mostra-se flexível para realizar análises quantitativas e qualitativas, sendo amplamente utilizada em diversas vertentes de várias áreas biomédicas.

Contudo apresenta as suas limitações, nomeadamente no âmbito dos tecidos, sobretudo quando estes são frescos.

Relativamente à área farmacêutica, a técnica mostrou-se bastante versátil, e com resultados confiáveis, não só comparou diferentes excipientes na parte dos comprimidos reduzidos a pó, como mediu as diferentes concentrações do paracetamol no estado líquido.

Na parte inerente aos tecidos orgânicos, este foi um estudo preliminar, sendo feita uma análise sucinta das várias amostras analisadas, correspondentes a de tecidos mamários da espécie *Felis catus domesticus*, onde o foco foi procurar alterações que fossem indicativas de patologia. Ainda assim, os resultados obtidos foram ao encontro da literatura, nomeadamente na identificação de tecidos normais (sem alterações morfológicas) e de tecidos com possíveis lesões ou neoplasias, em particular, onde as bandas espectrais são correspondentes a calcificações. É facto que, esta é uma área que apresenta uma forte necessidade de ser investigada.

Durante o decorrer deste trabalho de investigação foram encontradas algumas limitações que podem ser expostas de seguida em forma de sugestão para trabalho futuro, tais como:

- Análise de amostras frescas em formol, idealmente seria analisar amostras em parafina de modo a minimizar as dificuldades encontradas na aquisição de dados das amostras em formol;
- Desidratação dos tecidos e consequente movimento;
- Estudo de amostras não identificadas, futuramente seria ideal o estudo de amostras com zonas tumorais devidamente identificadas;
- Enorme *background* presente nos espectros adquiridos;

Face a estas considerações, este trabalho de investigação, apesar de preliminar, demonstrou através dos resultados, que esta técnica é uma mais valia no seio da investigação, nomeadamente na área oncológica, uma vez que, se for fortemente estudada poderá contribuir para um bom diagnóstico e posterior tratamento, pois pode fornecer uma avaliação rápida e em tempo real dos tecidos.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação pode ser explorado em vários tópicos a seguir apresentados:

- Validação da técnica de Espetroscopia de Raman para monitorização de concentrações de fármacos em líquidos.
- Estudo estatístico de amostras cancerígenas com apoio de amostras de tecidos orgânicos correspondentes a falsos positivos.
- Estudar amostras de tecidos orgânicos com neoplasias malignas do trato gastrointestinal.

6. Apêndices

O cancro gastrointestinal (GIC) é um dos principais contribuintes para a morbilidade e mortalidade relacionadas com o cancro mundialmente (Wan *et al.*, 2017). Do trato gastrointestinal, o cancro gástrico é o que apresenta maior relevo, sendo o quinto tipo de cancro mais comum em todo mundo e a segunda causa mais comum de morte relacionada com o cancro. Quando a sua deteção ocorre numa fase avançada, a taxa de sobrevida de 5 anos é baixa, representando entre 10% a 20%. Por outro lado, numa fase precoce, as taxas de sobrevida de 5 anos encontram-se entre os 96% e os 99% (Kim, 2015).

O adenocarcinoma é o tipo histológico de cancro gástrico mais frequente, sendo considerado o mais agressivo e o que apresenta um prognóstico sombrio, representando mais de 95% dos tumores. Além disso, existem outros tipos histológicos que embora com percentagens menores, tais como, o Sarcoma do Estroma Gastrointestinal (GIST), o Leiomioma Gástrico, o Linfoma e o Tumor Neuroendócrino, também se destacam (Ramos *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, ocorreram desenvolvimentos revolucionários na endoscopia, sendo esta considerada indispensável quer para o diagnóstico quer para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal (Akarsu, M., & Akarsu, C., 2018; Garai *et al.*, 2015).

A endoscopia gastrointestinal convencional é uma modalidade que utiliza a dispersão da luz branca para a deteção de lesões da mucosa, de massas ulcerosas e pólipos (Akarsu, M., & Akarsu, C., 2018; Garai *et al.*, 2015; Kim, 2018). Esta tecnologia limitou-se a detetar lesões com base em mudanças morfológicas brutas. O diagnóstico é baseado primeiramente na amostragem da biópsia de características endoscópicas macroscópicas óbvias, ou com base na amostragem da biópsia cega aparecendo a mucosa normal. Estas biópsias aleatórias são claramente ineficientes e perdem informação relevante (Garai *et al.*, 2015).

Com o aumento do seu uso está associado o aumento das suas limitações. Estas prendem-se pela ineficácia da deteção e discriminação de lesões minuciosas e sutis, pelo que se pode perder histologia significativa (Kim, 2018).

A luz branca convencional é frequentemente incapaz de fornecer informações funcionais e macroscópicas estruturais, impedindo a deteção precoce de malignidades nos estágios iniciais. Além disso, a deteção endoscópica é inadequada para a deteção de pequenas lesões, tais como, pólipos, e de lesões planas/lisas contribuindo para a perda de histologia significativa. Estas limitações podem ser melhoradas com a adição de imagens latentes que sejam capazes de fornecer a informação funcional (isto é, molecular) e macroscópica estrutural. A incorporação de uma modalidade molecular de imagem latente pode auxiliar os clínicos a localizar,

diagnosticar, e encenar lesões pequenas que de outra forma seria difícil de detetar, assim como melhorar a caracterização das mesmas. Por esta razão, o valor diagnóstico da endoscopia convencional é limitado (Akarsu, M., & Akarsu, C., 2018). Foram feitos diversos avanços nas tecnologias de imagem endoscópica para colmatar lacunas neste âmbito de modo a superar as necessidades médicas (Garai *et al.*, 2015; Kim, 2018). Estas levam a uma constante mudança evolutiva na tecnologia endoscópica, visando avanços na imagem, capazes de melhorar a deteção de lesões pequenas/planas e as alterações das mucosas, fornecendo a caracterização bioquímica do tecido de interesse e histologia *in vivo* e biópsia ótica (Garai *et al.*, 2015).

Existe uma necessidade de identificar lesões em profundidade e realizar um mapeamento adequado para o tratamento adequado, sendo ainda um objetivo a atingir.

A taxa de sobrevivência depende principalmente dos estágios do cancro gástrico. Consequentemente, a deteção na fase adiantada é vital e importante para assegurar um prognóstico excelente.

A carcinogénese, processo de formação de uma neoplasia, do cancro gástrico, é um processo que engloba várias etapas, sendo um processo em cascata (Kim, 2015). Maioritariamente, é iniciada a partir de infeção com *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), e está progressivamente envolvida na transformação da metaplasia intestinal (IM) à displasia antes do início da transformação neoplásica.

Algumas úlceras gástricas são carcinomas gástricos ulcerados. Diferenciar maligno de benigno relativamente às úlceras é completamente importante. As úlceras gástricas apresentam características fisiológicas óticas diferentes do adenocarcinoma gástrico (Wan *et al.*, 2017).

A Espetroscopia de Raman integrada com modelagem espectral semi-quantitativa (por exemplo, ADN, lípidos, glicoproteínas, proteínas e sangue) revela as mudanças progressivas de constituintes bioquímicos no tecido gástrico associado à pré-neoplasia e transformação neoplásica (Kim, 2015). Aproveitando a capacidade espectral de Raman de recolher informações importantes de impressão digital de componentes inter e/ou intracelulares, como proteínas, lípidos e ADN em células e tecidos. Esta técnica mostrou ser uma grande promessa para avaliações histopatológicas no nível biomolecular (Kim, 2015).

Até à data, a maioria dos estudos de Espetroscopia de Raman do tecido gástrico têm sido principalmente focados na chamada impressão digital da gama de 800 – 1800 cm^{-1} , com precisões encorajadoras variando de 85% a 95%. A vantagem inigualável da técnica de *Fingerprint* (FP) da Espetroscopia de Raman decorre da sua capacidade de fornecer informações bioquímicas altamente específicas sobre estruturas de espinha dorsal do ADN, do

ARN, das proteínas, dos lípidos, do colagénio, e de outras macromoléculas biológicas em células e tecidos (Zhou *et al.*, 2016).

Num estudo de Zhou *et al.*, foram utilizadas 38 amostras de tecido normal e 37 amostras de tecido com cancro gástrico. De acordo com a classificação de Lauren, o tecido não saudável foi histologicamente dividido em duas categorias: 9 amostras do tipo difuso e 28 do tipo intestinal.

Realizou-se a comparação das intensidades médias de FP e de *High Wavenumber* (HW) dos espetros de Raman com os seus desvios-padrão. Os picos Raman do tecido proeminente na região do FP são observados em 829, 853, 879, 937, 1003, 1033, 1086, 1127, 1157, 1173, 1207, 1319, 1338, 1448, 1526, e 1658 cm^{-1} , tal como indica a **Figura 1a** (Zhou *et al.*, 2016).

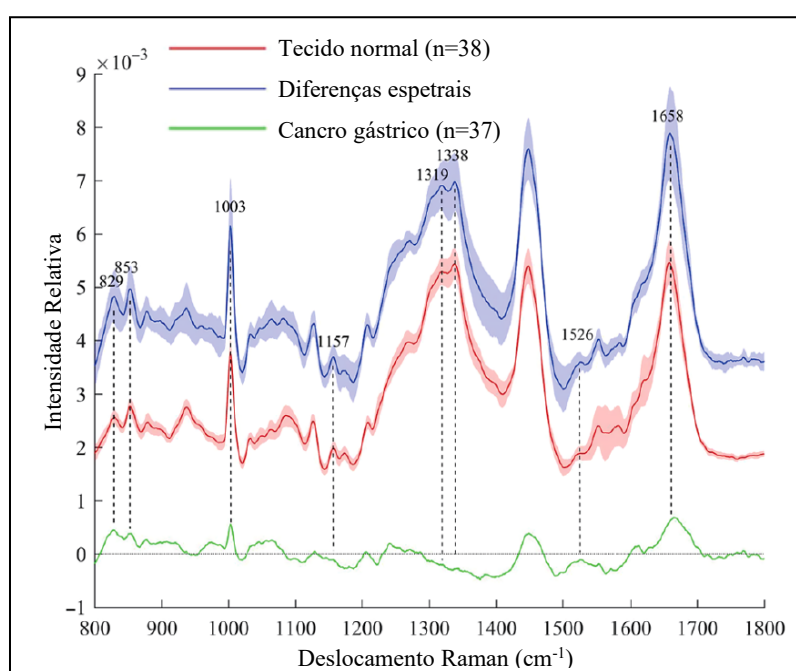


Figura 1a. Média de espetros Raman (FP) de 38 tecidos normais e 37 tecidos com cancro gástrico. Adaptado de (Zhou *et al.*, 2016).

Verificaram-se que as intensidades dos picos Raman são notavelmente mais altas no tecido gástrico. O pico de 1157 cm^{-1} , correspondente à cadeia de polieno de carotenóides, mostrou-se significativamente mais forte no tecido cancerígeno, o que pode indicar que estas células tenham a capacidade de resistir à função antioxidante dos carotenóides (Chen *et al.*, 2014).

No entanto, o pico de 853 cm^{-1} , caracterizado pela prolina do colagénio, mostrou-se mais baixo no tecido gástrico. Este resultado, poderá ser explicado, pela possibilidade de as células cancerígenas sintetizarem e secretarem a metaloproteínase de matriz que permite a degradação das proteínas matriciais, tais como, o colagénio, levando ao auxílio da metástase do cancro (Chen *et al.*, 2014).

Além disso, a proteína e ácido nucleico com sinais Raman em 1319 e 1338 cm^{-1} , respectivamente, encontram-se significativamente mais elevados no tecido gástrico quando comparados com o tecido normal. Esta observação apresenta como fundamento, um aumento na cromatina nuclear durante a replicação excessiva do ADN durante a transformação maligna (Zhou *et al.*, 2016).

A região HW (2800 a 3000 cm^{-1}) contém menos informações bioquímicas do que a região FP (**Figura 1b**).

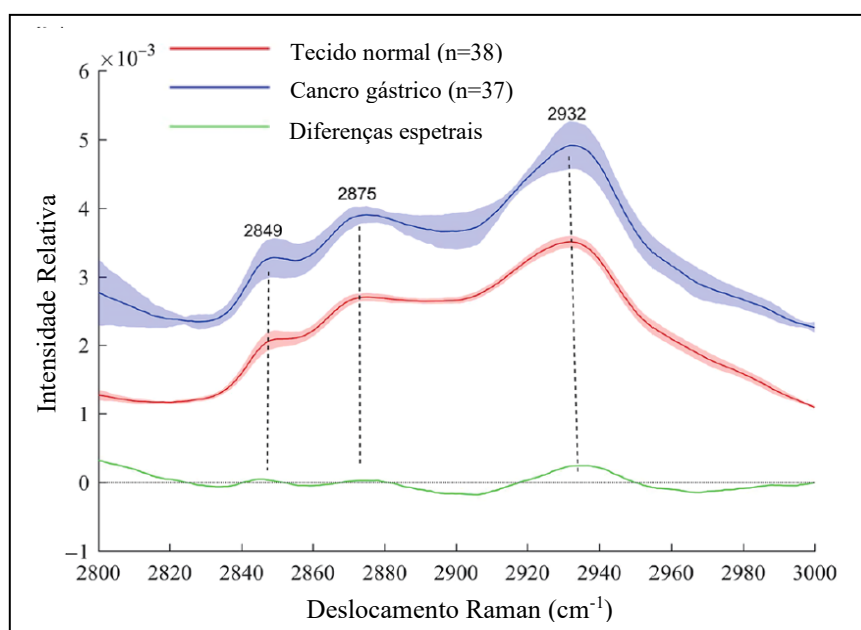


Figura 1b. Média de espectros Raman (HV) de 38 tecidos normais e de 37 tecidos com cancro gástrico. Adaptado de (Zhou *et al.*, 2016).

Os picos Raman encontrados são em 2849, 2875 e 2932 cm^{-1} . O sinal proteico em 2932 cm^{-1} foi significativamente mais forte no tecido normal do que no tecido cancerígeno. Os outros dois picos não apresentaram diferenças significativas. No entanto, este resultado não significa que a região de HW seja considerada menos importante para o diagnóstico.

A região HW contém informações relacionadas especificamente com o alongamento de proteínas CH_3 , que são complementares às propriedades da região FP. Com base noutros estudos, é possível referir que a informação bioquímica fornecida é considerada suficiente para o diagnóstico de cancro.

A distinção entre tipos intestinais e difusos do adenocarcinoma gástrico é clinicamente relevante e pode ter influência na estratégia do tratamento. O potencial clínico de proximidade da Espectroscopia de Raman do infravermelho para identificar diferentes subtipos de adenocarcinoma gástrico foi relatado em 2010 (Zhou *et al.*, 2016).

Na **Tabela 1a**, encontra-se representada a região de detecção Raman e a impressão digital de cada tipo de adenocarcinoma.

Tabela 1a. Tipo de adenocarcinoma gástrico com a respectiva região de detecção e impressão digital.

Lesão	Região de detecção de Raman	Impressão digital
Adenocarcinoma tipo-intestinal	2800-3000 cm^{-1}	800-1800 cm^{-1}
Adenocarcinoma tipo-difuso	2800-3000 cm^{-1}	800-1800 cm^{-1}

De acordo com um estudo, entre 100 amostras de tecido gástrico, 70 eram histologicamente normais e 30 correspondiam a adenocarcinomas. Dentro destas, 18 representam o tipo intestinal e 12 o tipo difuso (Kim, 2015).

Na **Figura 1c** encontram-se representada a média dos espectros do tecido normal, adenocarcinoma tipo intestinal e adenocarcinoma tipo difuso. Verificaram-se diferenças significativas nos espectros de Raman entre o tecido do estômago normal e os dois subtipos de adenocarcinoma gástrico, particularmente nas regiões espectrais de 850 – 1150, 1200 – 1500 e 1600 – 1750 cm^{-1} , que contêm sinais relacionados a proteínas, ácidos nucleicos e lípidos (Zhou *et al.*, 2016).

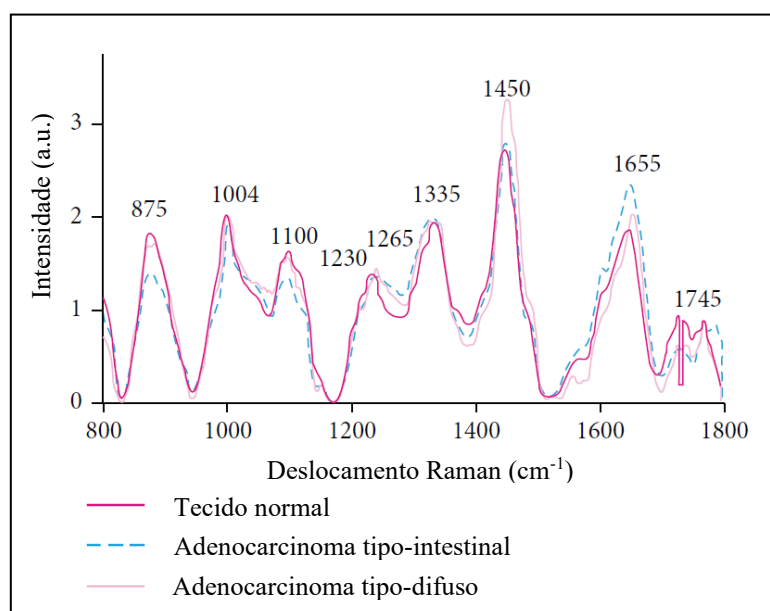


Figura 1c. Comparação da média dos espectros NIR de Raman, de 70 amostras normais de tecido do estômago: 18 adenocarcinomas do tipo intestinal e 12 do tipo difuso. Adaptado de (Kim, 2015).

Os adenocarcinomas apresentam-se diferentes nas bandas espectrais em comparação com o tecido normal. As intensidades mais baixas encontram-se localizadas nas bandas a 875, 1004, 1100, 1230 e 1745 cm^{-1} , e mais altas nas bandas centradas a 1265, 1335, 1450 e 1655 cm^{-1} . Este resultado poderá indicar que a presença de Amidas, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos tende a ser maior no tecido com cancro gástrico. Comparando apenas entre os dois subtipos de adenocarcinoma (intestinal *versus* difuso), o tipo difuso apresenta maiores intensidades nas bandas a 875, 1100 e 1450 cm^{-1} e menor a 1655 cm^{-1} , correspondente à Amida I de proteínas. Estes revelam a existência de diferenças espectrais significativas entre o adenocarcinoma do tipo difuso e o adenocarcinoma do tipo intestinal, sendo a presença da Amida I e proteínas maior no tipo intestinal, confirmando a utilidade da Espectroscopia de Raman no infravermelho para discriminação do subtipo de adenocarcinoma.

Confrontando as duas comparações apresentadas nas **Figuras 1c** e **1d**, as intensidades de banda de tecido normal são superiores, em relação ao tecido tumoral, de 800 a 1230 cm^{-1} e de 1700 a 1800 cm^{-1} , respetivamente. Estes resultados concordam entre si, exceto no que diz respeito ao adenocarcinoma do tipo difuso, que apresenta maior intensidade na banda de 1780 a 1800 cm^{-1} , aproximadamente (Kim, 2015).

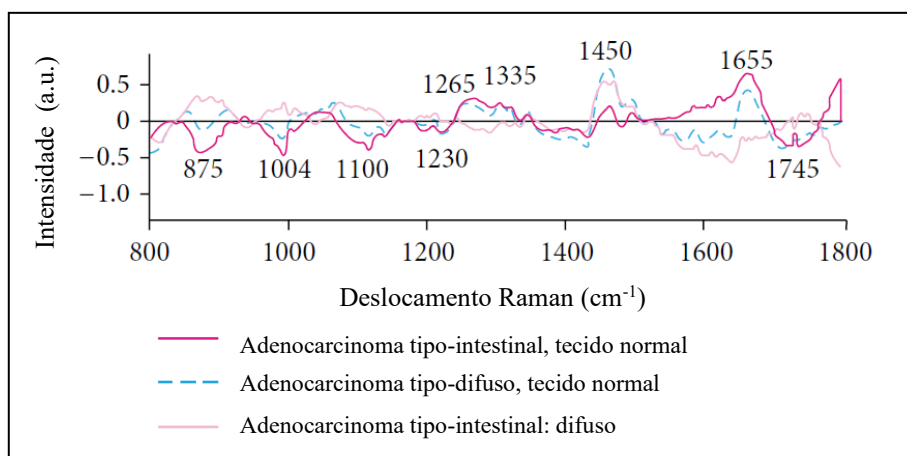


Figura 1d. Comparação da média dos espectros NIR de Raman, de 70 amostras normais de tecido do estômago: Diferença espectral obtida a partir dos espectros médios de Raman dos três tipos de tecido. Adaptado de (Kim, 2015).

Referências Bibliográficas

- Acosta, C., Vázquez, P., Moreno, S., Avila, R., Vertiz, A., & Rangel, A. (2016). Análisis de medicamentos mediante espectroscopia Raman. *VII Congresso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de La Salud*.
- Akarsu, M., & Akarsu, C. (2018). Evaluation of New Technologies in Gastrointestinal Endoscopy. *Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons*, 22(1).
- B, H., RJ, H., BK, K., NR, H., AB, C., & DR, L. (2016). *Breast cancer biology varies by method of detection and may contribute to overdiagnosis.*, 160(2), pp. 454-462.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394-424.
- Brozek-Pluska, B., Musial, J., Kordek, R., Bailo, E., Dieinge, T., & Abramczyk, H. (2012). Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis. *The Analyst*, 137(16), pp. 3773-3780.
- Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), pp. 209-215.
- Carvalho, L. F., Tellez, C., Santos, L., O’Callaghan, K., O’Sullivan, J., Soares, L. E., . . . Byrne, H. J. (2017). Raman spectroscopic analysis of oral cells in the high wavenumber region. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(3), pp. 255-262.
- Chao, K., Dhakal, S., Qin, J., Peng, Y., Schmidt, W. F., Kim, M. S., & Chan, D. E. (2017). A Spatially Offset Raman Spectroscopy Method for Non-Destructive Detection of Gelatin-Encapsulated Powders. *Sensors*, 17(3), p. 618.
- Chen, Y., Dai, J., Zhou, X., Liu, Y., Zhang, W., & Peng, G. (2014). Raman Spectroscopy Analysis of the Biochemical Characteristics of Molecules Associated with the Malignant Transformation of Gastric Mucosa. *PLOS ONE*, 9(4).
- Cregan, R. F., Mangan, B. J., Knight, J. C., Birks, T. A., Russell, P. S., Roberts, P., & Allan, D. C. (1999). Single-Mode Photonic Band Gap Guidance of Light in Air. *Science*, 285(5433), pp. 1537-1539.
- Ellis, F. (2002). Paracetamol - a curriculum resource. London: Royal Society of Chemistry.

- Esmonde-White, K. A., Cuellar, M., Uerpmann, C., Lenain, B., & Lewis, I. R. (2017). Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(3), pp. 637-649.
- Fabian, H., Thi, N. A., Eiden, M., Lasch, P., Schmitt, J., & Naumann, D. (2006). Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(7), pp. 874-882.
- Fenn, M. B., Xanthopoulos, P., Pyrgiotakis, G., Grobmyer, S. R., Pardalos, P. M., & Hench, L. L. (2011). Raman Spectroscopy for Clinical Oncology. *Advances in Optical Technologies*, 2011.
- Garai, E., Sensarn, S., Zavaleta, C. L., Loewke, N. O., Rogalla, S., Mandella, M. J., . . . Contag, C. H. (2015). A Real-Time Clinical Endoscopic System for Intraluminal, Multiplexed Imaging of Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles. *PLOS ONE*, 10(4).
- Jermyn, M., Desroches, J., Aubertin, K., St-Arnaud, K., Madore, W.-J., Montigny, E., . . . Leblond, F. (2016). A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. *Physics in Medicine & Biology*, 61, pp. 370-400.
- Kallaway, C., Almond, L. M., Barr, H., Wood, J., Hutchings, J., Kendall, C., & Stone, N. (2013). Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10, pp. 207-219.
- Kim, H. H. (2015). Endoscopic Raman Spectroscopy for Molecular Fingerprinting of Gastric Cancer: Principle to Implementation. *BioMed Research International*, 2015(1), pp. 1-9.
- Kim, J.-W. (2018). Usefulness of Narrow-Band Imaging in Endoscopic Submucosal Dissection of the Stomach. *Clinical Endoscopy*, 51(6), pp. 527-533.
- Kong, K., Kendall, C., Stone, N., & Notingher, I. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, pp. 121-134.
- Konorov, S. O., Addison, C. J., Schulze, H. G., Turner, R. F., & Blades, M. W. (2006). Hollow-core photonic crystal fiber-optic probes for Raman spectroscopy. *Optics Letters*, 31(12), pp. 1911-1913.
- Kourkoumelis, N., Polymeros, A., & Tzaphlidou, M. (2012). Background Estimation of Biomedical Raman Spectra Using Geometric Approach. *Spectroscopy: An International Journal*, 27(5-6), pp. 311-317.

- Kuhar, N., Sil, S., Verma, T., & Umapathy, S. (2018). Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. *Royal Society of Chemistry*, 8(46), pp. 25888-25908.
- Kumamoto, Y., Harada, Y., Takamatsu, T., & Tanaka, H. (2018). Label-free Molecular Imaging and Analysis by Raman Spectroscopy. *Acta Histochemica et Cytochemica Official Journal of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry*, 51(3), pp. 101-110.
- Lakhwani, G. R., Sherikar, O. D., & Mehta, P. J. (2013). Nondestructive and Rapid Concurrent Estimation of Paracetamol and Nimesulide in Their Combined Dosage Form Using Raman Spectroscopic Technique. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), pp. 211-216.
- Lazaro-Pacheco, D., Shaaban, A. M., Rehman, S., & Ihteshamur, R. (2019). Raman spectroscopy of breast cancer. *Applied Spectroscopy Reviews*, pp. 1-29.
- Lee, C. H., Dershaw, D. D., Kopans, D., Evans, P., Monsees, B., Monticciolo, D., . . . Burhenne. (2010). Breast Cancer Screening With Imaging: Recommendations From the Society of Breast Imaging and the ACR on the Use of Mammography, Breast MRI, Breast Ultrasound, and Other Technologies for the Detection of Clinically Occult Breast Cancer. *American College of Radiology*, 7(1), pp. 18-27.
- Li, Q., Gao, Q., & Zhang, G. (2014). Classification for breast cancer diagnosis with Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 5(7), pp. 2435-2445.
- Li, Q., Hao, C., & Xu, Z. (2017). Diagnosis of Breast Cancer Tissues Using 785 nm Miniature Raman Spectrometer and Pattern Regression. *Sensors*, 17(3), p. 627.
- Li, Q.-B., Wang, W., Liu, C.-H., & Zhang, G.-J. (2015). Discrimination of Breast Cancer from Normal Tissue with Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Applied Spectroscopy*, 82(3), pp. 450-455.
- Li, Y.-S., & Church, J. S. (2014). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), pp. 29-48.
- Lin, K., Wang, J., Zheng, W., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., & Huang, Z. (2016). Rapid Fiber-optic Raman Spectroscopy for Real-Time In Vivo Detection of Gastric Intestinal Metaplasia during Clinical Gastroscopy. *Cancer Prevention Research*, 9(6), pp. 476-483.
- Lyndgaard, L. B., Berg, F. v., & Juan, A. (2013). Quantification of paracetamol through tablet blister packages by Raman spectroscopy and multivariate curve resolution-alternating least squares. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 125, pp. 58-66.

- Martínez, J. C., Bolaños, G. R., Chequer, N. A., Reyes, A. I., Cortes, A., & González, J. L. (2012). Raman Spectroscopy: a Test Novel Technique for Quality Control In the Acetylsalicylic Acid. *International Journal of Optics and Applications*, 2(5), pp. 56-61.
- Nijssen, A., Koljenović, S., Schut, T. C., Caspers, P. J., & Puppels, G. J. (2009). Towards oncological application of Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 2(1-2), pp. 29-36.
- Paudel, A., Raijada, D., & Rantanen, J. (2015). Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, pp. 3-20.
- Penido, C. A., Pacheco, M. T., Lednev, I. K., & Jr., L. S. (2016). Raman spectroscopy in forensic analysis: identification of cocaine and other illegal drugs of abuse. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47, pp. 28-28.
- Raman Spectrum*. Disponível em: <https://www.nanophoton.net/raman-spectroscopy/lessons/lesson-1> (Consultado em: 11/05/2019).
- Ramos, M. K., Pereira, M. A., Yagi, O. K., Dias, A. R., Charruf, A. Z., Oliveira, R. J., . . . Ceconello, I. (2018). Surgical treatment of gastric cancer: a 10-year experience in a high-volume university hospital. *Clinics*, 73(1).
- Santos, I. P., Barroso, E. M., Schut, T. C., Caspers, P. C., Lanschot, C. G., Choi, D.-H., . . . Doorn, H. C. (2017). Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. *Analyst*, 142, pp. 3025-3047.
- Sun, L., Xu, Z., Huang, W., Wu, S., Lin, X., Zhu, F., . . . Zeng, H. (2016). Preliminary study of differentiating smears from cancerous and non-cancerous nasopharyngeal tissue using confocal Raman spectroscopy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(4), pp. 823-831.
- Surmacki, J., Musial, J., Kordek, R., & Abramczyk, H. (2013). Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis. *Molecular Cancer*, 48, pp. 1-12.
- Vargas-Obieta, E., Martínez-Espinosa, J. C., Martínez-Zerega, B. E., Jave-Suárez, L. F., Aguilar-Lemarroy, A., & González-Solís, J. L. (2016). Breast cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. *Lasers in Medical Science*, 31(7), pp. 1317-1324.
- Wan, Q.-S., Wang, T., & Zhang, K.-H. (2017). Biomedical optical spectroscopy for the early diagnosis of gastrointestinal neoplasms. *Tumor Biology*, 39(7), pp. 1-12.
- Wang, J., Lin, K., Zheng, W., Ho, K. Y., Teh, M., & Yeoh, K. G. (2015). Simultaneous fingerprint and highwavenumber fiber-optic Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma at endoscopy. *Scientific Reports*, 5.

- Wiley, J., & Sons. (2008). *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*. (S. Šašić, Ed.)
- Zavaleta, C. L., Garai, E., Liu, J. T., Sensarn, S., Mandella, M. J., Van de Sompel, D., . . . Gambhir, S. S. (2013). A Raman-based endoscopic strategy for multiplexed molecular imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 2288-2297.
- Zeña, A. C., Zângaro, R. A., Pacheco, M. T., & Jr, S. L. (2014). Fontes de Ruídos e Relação Sinal-Ruído em Espectrômetro Raman Dispersivo Utilizando Câmera CCD. *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB*, pp. 2770-2773.
- Zheng, C., Liang, L., Xu, S., Zhang, H., Hu, C., Bi, L., . . . Xu, W. (2014). The use of Au@SiO₂ shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy for human breast cancer detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(22), pp. 5425-5432.
- Zhou, X., Dai, J., Chen, Y., Duan, G., Liu, Y., Zhang, H., . . . Peng, G. (2016). Evaluation of the diagnostic potential of ex vivo Raman spectroscopy in gastric cancers: fingerprint versus high wavenumber. *Journal of Biomedical Optics*, 21(10).