



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS NATURAIS – FÍSICA
CENTRO DE CIÊNCIAS, EDUCAÇÃO E LINGUAGENS – CCEL- BACABAL
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS – FÍSICA

ADAILTON DE SOUSA MESQUITA
BENEDITO RIBEIRO DE MATOS JÚNIOR

**TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADAS A DIAGNÓSTICOS DE
CÂNCER**

BACABAL
2022

ADAILTON DE SOUSA MESQUITA
BENEDITO RIBEIRO DE MATOS JÚNIOR

**TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADAS A DIAGNÓSTICOS DE
CÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Naturais – Física, da Universidade
Federal do Maranhão – UFMA como requisito final e
título de Licenciado em Física.

Orientador: Ariel Nonato Almeida de Abreu Silva

BACABAL
2022

MESQUITA, Adailton de Sousa
JÚNIOR, Benedito Ribeiro de Matos

Pag.62

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Ciências Naturais com
Habilitação em Física, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, 2021
Orientador: Prof.^a Dr. Ariel Nonato Almeida de Abreu Silva

TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADAS A DIAGNÓSTICOS DE
CÂNCER

CDU: 00000000

ADAILTON DE SOUSA MESQUITA
BENEDITO RIBEIRO DE MATOS JÚNIOR

**TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADAS A DIAGNÓSTICOS DE
CÂNCER**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Naturais – Física, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA como requisito final e título de Licenciado em Física.

Orientador: Ariel Nonato Almeida de Abreu Silva

Aprovado em: _____/_____/_____

Prof. Dr. ARIEL NONATO ALMEIDA DE ABREU
SILVA

Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Naturais – Física – UFMA – Bacabal

Prof. Dr.

Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Naturais – Física – UFMA – Bacabal

Prof. Dr

Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Naturais – Física – UFMA – Bacabal

Dedicamos aos nossos pais e amigos, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus. Sem Ele jamais teria começado esta jornada árdua e gratificante.

À este Campus e seu corpo docente que nos encorajaram, motivaram e acompanharam nesta jornada.

Ao nosso orientador, Dr. Ariel Nonato Almeida de Abreu Silva, pela paciência, trabalho, apoio e incentivo.

Às nossas famílias pelo amor e apoio incondicional.

Aos nossos amigos em especial Márcio e Mayara que fizeram parte da nossa formação e estão diretamente ligados nessa conquista.

E a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desta jornada, o nosso muito obrigado.

“Os ideais que iluminaram meu caminho e que de tempos em tempos me dão nova coragem para enfrentar a vida com alegria são a bondade, a beleza e a verdade”

(Albert Einstein)

RESUMO

Novos avanços técnicos científicos para o entendimento da ascensão de doenças como o câncer, podem surgir através da inovação de biomarcadores, que permitirão e auxiliarão no controle da progressão da doença e, conseqüentemente, no aperfeiçoamento da avaliação prognóstica. A Espectroscopia Raman é uma poderosa ferramenta analítica de diagnóstico e investigação que pode auxiliar na descoberta da base molecular da doença e fornecer as informações moleculares de forma quantificáveis e objetivas para o diagnóstico e, posteriormente, avaliação de tratamento. Esta é uma técnica baseada em vibrações/rotações moleculares que ao serem associadas a ligações químicas em uma dada amostra, consegue-se obter informações sobre a composição, estrutura e interações intermoleculares. Esta técnica, conhecida como espalhamento Raman, ocorre quando um feixe luz monocromático dispersado, interage com um determinado material, resultando que a luz será espalhada com frequência óptica deslocada (para cima ou para baixo) com relação a luz incidente, ocorrendo pequenas trocas de frequências específicas do material que está sendo analisado. Ao observar a descrição da intensidade da luz, ela se dispersa inelasticamente em função da frequência, sendo que apenas uma única impressão digital espectroscópica da amostra de tecido é obtida. Desta forma, como cada amostra tem uma composição única, o perfil espectroscópico decorrente de grupos moleculares ativos de Raman de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos permite a caracterização, discriminação e avaliação do tipo de tecido. Esta revisão bibliográfica fornece uma visão geral da teoria da Espectroscopia Raman, técnica usada na indústria em uma variedade de aplicações, em aplicações clínicas, incluindo detecção de Câncer de próstata, mama, cérebro, tumores circulantes e pancreático.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Aplicações, Câncer, Diagnóstico.

ABSTRACT

New technical scientific advances to understand the rise of diseases such as cancer may emerge through the innovation of biomarkers, which will allow and assist the control of disease progression and consequently improve prognostic assessment. Raman Spectroscopy is a powerful diagnostic and investigative analytical tool that can aid in the discovery of the molecular basis of disease and provide the molecular information in a quantifiable and objective manner for diagnosis and subsequently treatment evaluation. This is a technique based on molecular vibrations/rotations that, when associated with chemical bonds in a given sample, can provide information about the composition, structure, and intermolecular interactions. This technical analysis, known as Raman scattering, occurs when a scattered monochromatic light beam interacts with a given material, resulting in the light being scattered with an optical frequency shift (up or down) in relation to the incident light, with small frequency shifts specific to the material being analyzed. When looking at the description of the intensity of the light, it is scattered inelastically as a function of frequency, and only a single spectroscopic fingerprint of the tissue sample is obtained. Thus, as each sample has a unique composition, the spectroscopic profile arising from Raman active molecular groups of carbohydrates, lipids, proteins and nucleic acids allows for tissue type characterization, discrimination and evaluation. This literature review provides an overview of the theory of Raman Spectroscopy, a technique used in industry in a variety of applications, in clinical applications including detection of Prostate, Breast, Brain, circulating tumor and Pancreatic Cancer.

Keywords: Raman spectroscopy, Applications, Cancer, Diagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição Proporcional dos Tipos de Câncer mais incidentes estimados para 2020-2022.....	15
Figura 2 - Três tipos de processos de espalhamento que podem ocorrer quando a luz interage com uma molécula.....	21
Figura 4- (a) Média dos espectros micro-Raman característicos dos voluntários saudáveis do sexo feminino e masculino e o espectro de diferença calculado.	29
Figura 5 – Espectros SERS médios (linhas sólidas) de amostras de soro sanguíneo do (A) câncer e (B) grupo saudável. A área cinza ilustra a distribuição de todos os espectros no grupo. (C) A intensidade diferença entre os espectros médios em (A) e (B) em função do número de onda. ...	32
Figura 6 - (C) Curva característica de operação do receptor (ROC) de três tipos de métodos de classificação. Os valores da área sob a curva (AUC) são calculados.	33
Figura 7 - Parâmetros de previsão de métodos de classificação variados.....	34
Figura 8 - A, imagem de ressonância de germinoma (células germinativas) de fossa posterior. B, A preparação SMEAR, mostra as grandes células. C, o corte congelado do germinoma. D, a FFPE H&E mostra grandes células. E, semelhante à imagem FFPE, os principais recursos de diagnóstico são mostrados em SRH.	35
Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) de conjuntos de dados de exossomos. (a) Gráfico de dispersão do componente principal com agrupamentos coloridos de controle. (b) Componentes principais do resultado do PCA. (c) Os picos Raman relacionados com cada célula alcançada por PCA são mostrados no gráfico com cores 40 linhas	37
Figura 10 - a) SERS da amostra de fatia de tecido, coberta com AgNPs, de um paciente com câncer de pulmão. (b) Espectro Raman da mesma fatia de tecido amostra sem AgNPs. (c) o sinal Raman de AgNPs.....	38
Figura 11 - H&E corado e (b) tecido cervical normal não corado mostrando as camadas estromal, basal e intermediária e/ou superficial; (c) Raman espectral mapa mostrando as camadas estromal (azul), basal (vermelho) e intermediária e/ou superficial (verde); e (d) média dos espectros Raman de cada camada representativa	43
Figura 12 - As curvas de sombra dos espectros Raman de câncer gástrico e saudável. As curvas de sombra mostram os espectros Raman de todos os saudáveis (n = 40) e câncer gástrico (n=20)	

indivíduos que são separados por um deslocamento. O espectro médio de pessoas saudáveis é mostrado com uma curva preta (inferior) e paciente com câncer gástrico com uma curva tracejada vermelha (superior).....	45
Figura 13 – Espectros Raman de (a) carcinoma pouco diferenciado e tecidos normais, (b) carcinoma de células escamosas e tecidos normais, (c) adenocarcinoma e tecidos normais, e (d) carcinoma in situ e tecidos normais.	46
Figura 14 – Espectros pré-processados de classes de câncer de ovário versus todos os controles benignos para plasma, soro e urina. Principais gráficos: câncer de ovário sem quimioterapia (OC sem quimioterapia) versus controles. Gráficos inferiores: cânceres de ovário NACT (químio OC) versus controles. CO, cânceres do ovário; quimioterapia, quimioterapia; NACT, quimioterapia neoadjuvante.....	49
Figura 15 – Resultados de resolução de curva multivariada (MCR). Quantificação de eumelanina de ácido carboxílico (DHICA) em amostras de tumor de pele	52
Figura 16 - (a) Espectro SERS da fatia de tecido coberta com Ag-NPs de um paciente com câncer de fígado, (b) Espectro Raman da mesma fatia de tecido sem Ag-NPs. (c) O sinal de espalhamento Raman de Ag-NPs	53
Figura 17 – (a) Comparação do espectro SERS médio para as fatias de tecido de câncer de fígado (linha preta, n = 56) versus as normais (linha vermelha, n = 46). A parte sombreada é o desvio padrão. (b) O espectro de diferença dos espectros SERS normais de câncer.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características gerais dos estudos incluídos na revisão bibliográfica.....	26
Tabela 2 - Desempenho do modelo de classificação da linha celular folicular benigna da tireoide das linhagens celulares TC agrupadas por subtipo TC.	39
Tabela 3 - Comparação do desempenho diagnóstico do PCA-LDA e PLS-SVM.	41
Tabela 4 - Demonstração das bandas características	42

SUMÁRIO


INTRODUÇÃO	15
CAPITULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	19
1.1.1 Histórico	20
1.1.2 Efeito Raman	20
2.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFÍCIE APRIMORADA (SERS).....	23
CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA	24
2.1 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.....	25
2.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	26
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 CÂNCER.....	27
3.1.1 Câncer de Boca	28
3.1.2 Câncer Colorretal	31
3.1.3 Câncer de Cabeça	34
3.1.4 Câncer de Pulmão	36
3.1.5 Câncer de Tireóide	39
3.1.6 Câncer de Mama	40
3.1.7 Câncer do Colo de Útero	42
3.1.8 Câncer de Intestino	44
3.1.9 Câncer de Esôfago	45
3.1.10 Câncer de Ovário	48
3.1.11 Câncer de Pele	50
3.1.12 Câncer de Fígado	53
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

REFERÊNCIAS..... 57

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é responsável anualmente por cerca de 10 milhões de mortes, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em conjunto com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em um relatório publicado em outubro de 2020. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC do inglês International Agency for Research on Cancer) publicou em fevereiro de 2021 o relatório com a estimativa de incidência e mortalidade por Câncer em todo mundo e as projeções para 2040, prevendo um aumento de 2 milhões de mortes a cada 5 anos. No Brasil, segundo dados levantados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), que tem como base o Registro de Câncer do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde, o câncer de pele não melanoma é o que ocorre com mais frequência, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Estima-se que para os anos entre 2020 e 2022 os tipos de câncer mais comuns podem ser descritos em forma de percentual tal qual apresentados na Figura 1:

Figura 1- Distribuição Proporcional dos Tipos de Câncer mais incidentes estimados para 2020-2022

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil - INCA

Embora existam muitos trabalhos que se dedicam a estudar os mais diversos tipos de câncer, o diagnóstico do câncer ainda continua sendo um dos maiores desafios enfrentados no campo da medicina. Para Nóbrega *et al* (2016), as principais dificuldades enfrentadas no diagnóstico estão ligadas a infraestrutura inadequada, a ineficiência de algumas técnicas para o diagnóstico do câncer e o déficit na qualificação profissional.

O desenvolvimento de tumores malignos está ligado às mutações que influenciam os processos de reconstrução do DNA, tais como: fatores biológicos, endócrinos, comportamentais/ambientais e vida reprodutiva (INCA, 2019). Os estágios do câncer podem ser

definidos de acordo com a gravidade da progressão da doença, podendo ser resumidos da seguinte forma: Estágio 0, que está restrito na área inicial onde aparece ou seja ainda estão contidos nos ductos (carcinomas in situ), estágio 1, o tumor já se inicia nesta área, contudo sem comprometimento linfático, no estágio 2, o tumor já se espalha, comprometendo o sistema linfático, no estágio 3, o nódulo está espalhado em mais de um tecido, comprometendo o sistema linfático, podendo atingir músculos e pele, estágio 4, neste estágio o nódulo está espalhado por outros órgãos ou em todo corpo e por fim o estágio 5, que é a fase terminal.

Existem algumas técnicas que são utilizadas no diagnóstico de câncer, geralmente quando há a suspeita da doença, podendo-se destacar: tomografia computadorizada, radiografia, ressonância magnética, mamografia, densitometria óssea, ultrassonografia dentre outros. O diagnóstico por mamografia é o mais utilizado na avaliação das mamas, podendo gerar imagens utilizando Raios-X. Porém, a diferença para a radiografia está no material utilizado para gerar a imagem. Na mamografia utiliza-se de ródio (Rh) ou molibdênio (Mo) enquanto na radiografia usa-se o material metálico tungstênio (W), além do que a radiografia é indicada para avaliação das estruturas ósseas, pulmonares e articulares e não é indicada para gestantes. No caso da ultrassonografia, trata-se de uma técnica que não emprega radiação ionizante para que a imagem seja formada, sendo bastante segura para as mulheres gestantes. Ela se utiliza de ondas sonoras de frequência alta, que quando incidirem nos tecidos ou órgãos produzirá ecos. Estes são convertidos em imagem, e podem ser observados na tela do computador. O exame de ultrassonografia é o mais indicado do que a radiografia, na avaliação dos órgãos abdominais, vasos sanguíneos, imagens de tecidos moles, distinguindo cistos cheios de tumores sólidos e líquidos, por causa dos diferentes padrões de eco. Quando comparado à tomografia computadorizada e a ressonância magnética, ela não consegue detectar um tumor maligno de um benigno, além de estar limitada em algumas partes do corpo, já que as ondas não conseguem atravessar os ossos e nem a cavidade com o ar. Atualmente, a tomografia computadorizada do estilo espiral é a mais comumente utilizada, além de utilizar menos radiação é mais rápida do que a tomografia convencional, sendo capaz de criar imagens de superfícies internas dos órgãos, como, cólon (colonoscopia por tomografia computadorizada ou colonoscopia virtual) ou pulmões (broncoscopia virtual) e produzir imagens tridimensionais, enquanto a radiografia cria imagens bidimensionais. Assim como tomografia computadorizada, a ressonância magnética pode criar imagens transversais dos órgãos internos, contudo se utilizam de ímãs ao invés de

radiação, bobinas receptoras e ondas de radiofrequência para as criarem. Esta técnica é ideal para localizar alguns tipos de câncer, como tumores cerebrais, órgãos abdominais, estrutura do sistema musculoesquelético e diferenciar se é maligno ou benigno.

Com relação aos procedimentos, irão variar de acordo com cada caso. Quando um paciente está com fortes dores de cabeça e com dificuldade de enxergar é solicitado a ressonância magnética ou a tomografia computadorizada. Esses testes podem mostrar a presença, o tamanho e a localização de uma massa anômala, porém, não conseguem confirmar se a verdadeira causa é o câncer. Sendo assim, há outros procedimentos complementares que podem ser realizados, como exames de punção lombar para coleta de líquido (fluido incolor presente na medula espinhal e cavidade do cérebro) e hemograma completo, realizados em laboratório através de amostras de testes, de sangue e fluidos corporais, para constatar a presença de marcadores tumorais ou células malignas. Outro procedimento, é o mielograma, que é a retirada de material da célula óssea, realizado sob efeito de anestesia e em um centro cirúrgico, este exame tem como objetivo, analisar a produção de células sanguíneas e a morfologia pela medula óssea. Este material será analisado por hematologista ou patologista que irão investigar quais os tipos de cânceres como linfoma, leucemia e mieloma, que estão atacando as células sanguíneas. Em casos de pacientes com dores nas mamas, o médico pode solicitar uma mamografia e uma ultrassom mamária para a constatação ou não do nódulo, além de exames laboratoriais como: citologia e hemograma completo. Já em casos de dor abdominal, são realizados exames endoscópicos, onde através de um tubo flexível iluminado, o médico insere através da boca, vagina, uretra, ânus ou nariz para examinar os órgãos internos. Exemplo é a colonoscopia de um intestino grosso e a gastroscopia do estômago. Em câncer de pele não melanoma, além de exames clínicos, usa-se uma outra ferramenta importante na detecção de tumores que é a dermatoscopia. Um exame detalhado, que ao incidir uma luz sobre a pele, tem uma lente auxiliando na ampliação do campo entre 6 a 400 vezes o tamanho real.

Porém, geralmente para que se confirme o diagnóstico é realizado procedimento conhecido por biópsia, que por meio de uma agulha ou cirurgia é retirado um pedaço do tumor, onde através de exames microscópicos encontrarão as células cancerígenas ou benignas da amostra, além de revelar outras informações importantes, que podem influenciar o plano de tratamento proposto. Alguns exemplos como o câncer de próstata que após o exame de toque retal e valores de PSA, é realizado a biópsia prostática por via transperineal ou trans-retal, e o

câncer de mama que após exames clínicos e de imagem, a biópsia é recomendada para a retirada de um fragmento do nódulo. Essas amostras podem ser de um pedaço de tecido, todavia às vezes exame de sangue seja adequado como no caso para a detecção de leucemia. Este procedimento é o mais comum, já que não há necessidade de hospitalização por se tratar de um procedimento ambulatorial. Corta-se um pequeno pedaço do tecido com um bisturi e usando uma agulha oca os médicos recolhem a amostra se utilizando da ressonância magnética ou da tomografia computadorizada para se guiarem. Por ser geralmente doloroso, os pacientes recebem anestésico local.

Lima (2019) ressalta que é de suma importância o desenvolvimento de novas estratégias e tecnologias, que diminuam a frequente exposição a radiações, traumas psicológicos e físicos e que produzam uma melhoria considerável nos equipamentos e componentes de diagnóstico de cânceres. Sendo assim, alguns métodos experimentais têm fornecido contribuições notáveis no campo da química, biologia e física. Por causa da sua versatilidade, rapidez e caráter não destrutivo, é possível destacar a Espectroscopia Raman (ER) uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis. Esta técnica está relacionada com as transições rotacionais e vibracionais de moléculas, proveniente da interação da matéria com uma radiação monocromática, sendo ainda não invasiva, não destrutiva, imprescindível para o uso em diagnóstico. Esta é fundamental para o diagnóstico da composição química de tecidos e células, tendo a capacidade de sondar os estados vibracionais fundamentais de biomoléculas e desta forma conseguir uma abordagem óptica não destrutiva.

Neste sentido, a técnica de Espectroscopia Raman se revela uma poderosa ferramenta, podendo ser aplicada ainda em diversas áreas como: mineralogia, polímeros, semicondutores, ciência forense, farmacêutica, corrosão entre outros, não sendo necessário o uso de reagentes ou a necessidade de preparo da amostra. Para Melo (2018), a técnica vem sendo utilizada particularmente no campo da biologia ou medicina, para as análises de tecidos biológicos, análises histopatológicas, na exploração de atributos bioquímicos dos ossos e biópsia in vivo, auxiliando na detecção de vários tipos de câncer. Além da capacidade de demonstrar alterações espectrais em termos de metástases ósseas iniciadas por alguns tipos de câncer como: mama e próstata. Para autores como Esmonde-White *et al.* (2012) e Nyman *et al.* (2012) a espectroscopia Raman é utilizada para investigar a estrutura e composição do osso metastático, caracterizando as suas alterações químicas oriundas de algumas doenças. Deste modo, a Espectroscopia Raman

em relação às demais tecnologias ópticas é necessária para o diagnóstico precoce de tumores ósseos, além de alta precisão, tolerância e ultra sensibilidade com amostras aquosas em curto tempo de aquisição dos espectros ou análises.

Apesar da Técnica de Espectroscopia Raman ser uma técnica potencialmente importante no diagnóstico de câncer, conforme explanado anteriormente, trata-se ainda de uma abordagem pouco conhecida, devido ao reduzido número de trabalhos que se dedicam a fazer a utilização da técnica. Além disso, não existem muitos trabalhos que sintetizem o uso e avanços destas técnicas no campo diagnóstico de câncer. Diante disso, neste trabalho objetivamos fazer uma revisão bibliográfica, de caráter sistemático, descrevendo os principais avanços da técnica de espectroscopia Raman no diagnóstico de câncer. Para isso, inicialmente, no Capítulo 1 desse trabalho, apresentamos a fundamentação teórica do Espalhamento Raman, que inclui a discussão do ponto de vista clássico da Física que explica o efeito de Espalhamento. Em seguida, no Capítulo 2, apresentamos a metodologia empregada para esta revisão. No Capítulo 3, é apresentado o estudo de revisão a partir dos artigos pesquisados, no período entre 2017 - 2022, no banco de periódicos da Capes. Por fim, no Capítulo 4 são apresentadas as conclusões finais e perspectivas futuras para este trabalho.

CAPITULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Conforme previamente discutido, no capítulo introdutório, a técnica Raman é uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada para identificar grupo moleculares como biomarcadores associados ao Câncer. Nesse sentido, compreender como o espalhamento inelástico da luz ocorre é fundamentalmente importante para uma leitura e interpretação dos dados obtidos através dessa técnica. A frequência da radiação muda ao interagir com as moléculas vibrantes dentro de um material e revela as características das vibrações destes grupos moleculares. Assim, neste Capítulo, apresentaremos uma descrição geral da teoria clássica do espalhamento Raman a partir do estudo do campo elétrico interagindo com a matéria. Assim, tanto a radiação eletromagnética como o sistema material serão tratados classicamente.

1.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é uma técnica que vem sendo utilizada para identificação e estudo diagnóstico de diversos cânceres além de poder ser aplicada com meio de explorar as

propriedades de inúmeros materiais (orgânicos e inorgânicos). Neste sentido, a seguir veremos o método experimental em espectroscopia Raman e suas notáveis contribuições para a química, física e biologia, antes apenas teoricamente estudados, destacando sua rapidez, caráter não destrutivo e versatilidade.

1.1.1 Histórico

A técnica de espectroscopia Raman é uma forma de espectroscopia óptica que a partir de suas transições vibracionais no material e com aplicações de identificação molecular auxiliam na investigação da estrutura e propriedade da molécula observada. Esta técnica é baseada em um tipo de espalhamento inelástico observado quando há a interação da luz com a matéria, previsto por Smekal em 1923 e observado pela primeira vez experimentalmente por Raman em 1928.

Chandrasekhara Venkata Raman, desde criança se interessava por conteúdos científicos e logo tornou-se professor de Física na Universidade de Calcutá. Raman utilizou-se de materiais e equipamentos simples que estavam ao seu dispor para explorar seus estudos sobre a luz. Ele observou que um feixe de luz monocromático que viajava através de vários líquidos, se espalhava de várias formas, causando uma série de linhas de diferentes intensidades vibracionais. Este experimento lhe renderia em 1930, o Prêmio Nobel em Física.

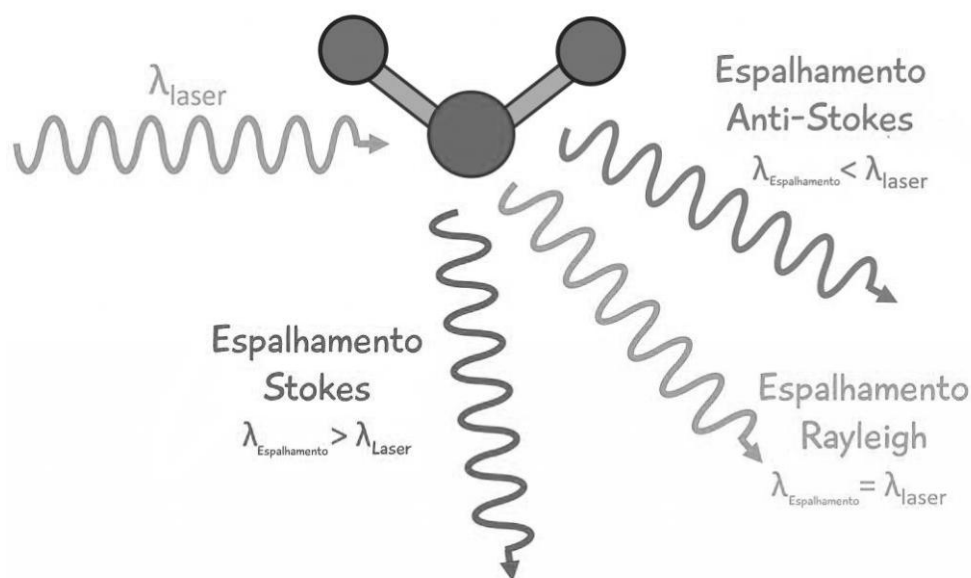
A técnica desenvolvida por Raman utilizava-se como fonte de excitação a lâmpada de mercúrio, que era equipada com um filtro, de modo a transmitir uma limitada extensão de comprimento de onda. Contudo, após o desenvolvimento dos lasers nos anos 60, os quais se tornariam fontes de excitação ideais para os espectrômetros. Devido as suas características de serem praticamente monocromáticos, os comprimentos de ondas indesejados eram eliminados por monocromadores, além do que, o feixe de luz produzido pelo laser era praticamente polarizado linearmente, possuindo em sua maioria diâmetro pequeno, ajudando no estudo de cristais e amostras. Atualmente os lasers mais utilizados são os gasosos, principalmente os de Argônio (Ar) e Kriptônio (Kr) (BARELLI, 2020).

1.1.2 Efeito Raman

De acordo com Santos *et al* (2019) a luz é uma onda eletromagnética com comprimento dentro do espectro visível ao olho humano e radiação monocromática ao incidir sobre um material, haverá uma interação onde os fótons incidentes excitam a molécula que estava

inicialmente em um estado vibracional eletrônico fundamental para um estado virtual (intermediário), no qual se recupera rapidamente (cerca de 10^{-14} s), através de três formas distintas.

Figura 2 - Três tipos de processos de espalhamento que podem ocorrer quando a luz interage com uma molécula.



Fonte: Santos *et al.*, 2019.

Na figura 2 observamos na primeira forma que o espalhamento ocorre elasticamente (Rayleigh), já que se emprega o princípio da conservação de energia, uma vez que o fóton é espalhado sem sofrer alteração em seu comprimento de onda, ou seja a energia é a mesma após a sua interação. Nas outras há um espalhamento inelástico (efeito Raman), que é a alteração do nível energético, que acontece quando a molécula ao retornar do seu estado virtual ao fundamental adquire mais ou menos energia quando comparado ao seu nível inicial.

$$\tilde{\nu}_{espectro} = \tilde{\nu}_{incidente} + \tilde{\nu}_{vibracional} : \text{Anti Stokes}$$

$$\tilde{\nu}_{espectro} = \tilde{\nu}_{incidente} - \tilde{\nu}_{vibracional} : \text{Stokes}$$

A nomenclatura Stokes e Anti Stokes dá-se de acordo com a lei de Stokes, onde diz que a frequência da luz fluorescente é sempre menor ou igual à frequência do feixe incidente. Implica-se que os Stokes são os que correspondem à lei, e os Anti Stokes são as opostas. Deste modo, na espectroscopia Raman a frequência de vibração (ν_m) é medida como uma diferença do feixe incidente (ν_0).

O espalhamento Raman pode ser explicado através da teoria clássica, onde a intensidade de um campo elétrico (\vec{E}) de uma onda eletromagnética, varia em função do tempo (t), conforme a equação abaixo:

$$|\vec{E}| = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.0)$$

Sendo \vec{E}_0 a amplitude da vibração, e ν_0 a frequência do laser. Se uma molécula diatômica é irradiada por essa onda, um dipolo eletrônico é induzido

$$|P| = \alpha |\vec{E}| = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.1)$$

α é uma constante de proporcionalidade, e é chamada de polarizabilidade, sendo que esta grandeza relaciona o quanto a molécula é suscetível ao campo aplicado. Se a molécula estiver vibrando com uma frequência ν_m a distância entre os núcleos (q) é escrita como:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t) \quad (1.2)$$

Na qual q_0 é a amplitude máxima da vibração. Para pequenas amplitudes, α é uma função linear de q . Assim podemos expandir α em série de Taylor:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q + \dots \quad (1.3)$$

Neste caso α_0 é a polarizabilidade da posição de equilíbrio, e $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$ é a taxa de mudança de α em função da variação de q , em relação à posição de equilíbrio. Substituindo a equação 1.2 na equação 1, obtém-se:

$$|P| = \alpha \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

$$|P| = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

combinando agora com a equação 1.1,

$$|P| = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + q_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cdot \cos(2\pi\nu_m t)$$

$$|P| = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_m)t] \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_m)t] \}$$

De acordo com a Teoria Clássica, o primeiro representa o espalhamento Rayleigh, já que o dipolo que irradia a luz de frequência ν_0 , ou seja, a frequência espalhada é a mesma incidente, enquanto no segundo termo, ocorre o espalhamento Raman com frequências $\nu_0 + \nu_m$ é o espalhamento anti-Stokes e $\nu_0 - \nu_m$ é o espalhamento Stokes.

1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFÍCIE APRIMORADA (SERS)

A espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS) é uma técnica altamente sensível que aprimora o espalhamento Raman de moléculas suportadas por alguns materiais nanoestruturados. O SERS permite a impressão digital estrutural de analitos de baixa concentração através da amplificação mediada por plasmon de campos elétricos ou aprimoramento químico. Devido à sua altíssima sensibilidade e seletividade, o SERS tem uma vasta gama de aplicações em química de superfície e interface, catálise, nanotecnologia, biologia, biomedicina, ciência de alimentos, análise ambiental e outras áreas. Aplicações recentes de SERS em vários campos de pesquisa são então destacadas, incluindo reações de superfície de sondagem e transferência de carga interfacial, caracterização estrutural e sensoriamento químico/biológico. Além disso, reprodutibilidade espectral, limitações técnicas do SERS e possíveis otimizações são discutidas para fornecer aos leitores orientações metodológicas para o desenho racional de estudos relacionados.

A Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (do inglês “Surface Enhanced Raman Spectroscopy”, SERS) ganha destaque recentemente dentre as técnicas de intensificação de sinal,

devido sua resolução da ordem de yoctomol (10^{-24} mol) enquanto que para a espectroscopia Raman convencional, a resolução é da ordem de milimol (10^{-3} mol), além do fato, de que o aparato experimental utilizado em SERS, em nada difere do aparato experimental da Espectroscopia Raman Convencional, a diferença encontra-se apenas na preparação da amostra em SERS para análise, a qual será retratada posteriormente (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019; STILES et al., 2008)

CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA

A metodologia adotada abrangeu pesquisa de caráter exploratório e descritivo, com uma abordagem qualitativa e os meios de investigação foram bibliográfica.

Gil (2007), quanto aos objetivos do projeto, a pesquisa exploratória visa ampliar o conhecimento expondo seus pontos principais. Segundo o autor tal método explora o fato buscando dar maior ciência sobre o assunto abordado.

Na pesquisa descritiva realiza-se o estudo, a análise, o registro e a interpretação dos fatos do mundo físico sem a interferência do pesquisador. São exemplos de pesquisa descritiva, as pesquisas mercadológicas e de opinião (Barros & Lehfeld, 2007).

Segundo Godoy (1995):

A pesquisa qualitativa não procura enumerar e/ou medir os eventos estudados, nem emprega instrumental estatístico na análise dos dados, envolve a obtenção de dados descritivos sobre pessoas, lugares e processos interativos pelo contato direto do pesquisador com a situação estudada, procurando compreender os fenômenos segundo a perspectiva dos sujeitos, ou seja, dos participantes da situação em estudo (p. 58).

A pesquisa de natureza qualitativa foi desenvolvida a partir do levantamento de artigos relacionados à temática. Uma pesquisa qualitativa acredita no valor da opinião dos indivíduos que compõem o sistema organizacional, sem preocupar-se com estatísticas e sim com conteúdo que irá compor a aprendizagem.

Segundo Lakatos e Marconi (2004, p. 69) “a metodologia qualitativa preocupa-se em analisar e interpretar aspectos mais profundos, descrevendo a complexidade do comportamento humano”.

Nesse tipo de estudo, foca-se no levantamento de dados a partir da leitura documental e

de relatórios de gestão e avaliação e dos marcos regulatórios que definem os parâmetros e os objetivos da política, tendo como pano de fundo os objetivos pensados por seus formuladores e os modos de como foram executados esses planejamentos.

Nas definições de Zanella (2009, p. 82) a pesquisa bibliográfica “se fundamenta a partir do conhecimento disponível e fontes bibliográficas, principalmente livros e artigos científicos”. Logo se subentende que a pesquisa bibliográfica se utiliza de modelos teóricos escritos por autores qualificados sob determinado conteúdo.

Desse modo caracterizam-se um estudo bibliográfico como métodos de investigação que se apoiam em livros, artigos e internet. Sobre esse tema, temos o pensamento de Boccato (2006, p. 266),

A pesquisa bibliográfica busca a resolução de um problema (hipótese) por meio de referenciais teóricos publicados, analisando e discutindo as várias contribuições científicas. Esse tipo de pesquisa trará subsídios para o conhecimento sobre o que foi pesquisado, como e sob que enfoque e/ou perspectivas foi tratado o assunto apresentado na literatura científica. Para tanto, é de suma importância que o pesquisador realize um planejamento sistemático do processo de pesquisa, compreendendo desde a definição temática, passando pela construção lógica do trabalho até a decisão da sua forma de comunicação e divulgação.

Segundo Gil (2007), a pesquisa bibliográfica é desenvolvida a partir de material já elaborado, constituído principalmente de livros e artigos científicos. Embora em quase todos os estudos seja exigido algum tipo de trabalho desta natureza, há pesquisas desenvolvidas exclusivamente a partir de fontes bibliográficas

2.1 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Inicialmente, para definir o grupo de artigos de partida que seriam utilizados no estudo da revisão, nós utilizamos o acervo de periódicos da Capes como banco de pesquisa. Para garantir uma melhor delimitação do tema de interesse, e adequado recorte temporal, nós utilizamos os filtros de pesquisa para encontrar resultados entre os anos de 2017-2021, utilizando como palavras-chaves (em inglês) no título: *Raman*, *Cancer* e *Diagnosis*. Foram encontrados como resultado um total de 50 artigos, dos quais 02 (dois) artigos foram desconsiderados tendo em vista estes serem do tipo *review* e 07 (sete) artigos por estarem indisponíveis para acesso. A intenção, neste primeiro momento, era de coletar o maior número de informações com relação a temática abordada.

Após a delimitação dos artigos a serem revisados, os mesmos foram agrupados conforme o tipo de Câncer que era abordado em seu estudo. Assim, na tabela 1 é apresentado a quantidade de artigos encontrados no que diz respeito ao tipo de câncer investigado por ER considerando os últimos 5 anos. Particularmente, considerando a especificidade, o Câncer de mama, neste recorte temporal, apresentou o maior número de estudos, totalizando 5 artigos científicos.

Tabela 1- Características gerais dos estudos incluídos na revisão bibliográfica

Tipo de Câncer	Quantidade
Câncer	13
Câncer de Mama	5
Câncer de Boca	4
Câncer de Pulmão	4
Câncer de Fígado	4
Câncer Colorretal	4
Câncer de Pele	3
Câncer de Tireóide	2
Câncer de Bexiga	2
Câncer de Cabeça	1
Câncer de Intestino	1
Câncer de Ovário	1
Câncer de Útero	1
Câncer do Esôfago	1
Câncer de Rins	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O estudo foi realizado a partir do levantamento de referências teóricas e documentais já analisadas, publicadas e atuais por meios escritos e eletrônicos - como livros, artigos científicos, revistas, páginas de *web sites* e outros. Os dados acolhidos, tem como bases no ano de 2017 até o ano de 2021.

A primeira seleção foi através de uma pesquisa bibliográfica e documental para analisar a aplicação da Técnica de Espectroscopia Raman no diagnóstico de Câncer.

A segunda seleção foi exploratória e descritiva, tendo em primeiro momento uma catalogação dos tipos de câncer, para que facilite na hora do estudo. Em um segundo momento, houve a exploração dos trabalhos onde foram evidenciados a utilização da Técnica Raman no diagnóstico do câncer.

Esses dados quando possível foram confrontados com outros tipos de diagnósticos de Câncer. A análise qualitativa se deu pela seleção de descrições e trechos importantes extraídos dos autores, análises documentais e das concepções epistemológicas com a ideia de compreender as particularidades de cada situação.

CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

Guerrini (2019), diz que a significativa heterogeneidade fenotípica, genética e molecular do câncer apresenta desafios para definir e caracterizar com precisão a doença em um determinado estado. Como resultado, esforços significativos foram concentrados na identificação de bancos de dados maiores de informações específicas e confiáveis de biomarcadores¹ quantitativos de câncer para o melhoramento no diagnóstico de câncer, prognóstico e avaliação de risco prever/monitorar a resposta ao tratamento. Além disso, o biomarcador de um tumor, na maioria dos casos não fornece uma classificação e discriminação da doença. Sendo assim, atualmente o foco da pesquisa do câncer é o desenvolvimento de ferramentas analgésicas sensíveis para a caracterização multidimensional rápida e econômica de biomarcadores a fim de produzir uma assinatura molecular específica da malignidade. Na última década, as abordagens da nanotecnologia surgiram

¹ Geralmente, refere-se a proteínas, genes e outras moléculas que influenciam como as células cancerosas crescem, se multiplicam, morrem e respondem ao tratamento.

como ferramentas promissoras para novos desafios na pesquisa do câncer, com foco na tradução eficiente da compreensão mais avançada da biologia do câncer em aplicações clínicas. No campo da nanociência, a Espectroscopia Raman amplificada por superfície -SERS (do inglês, Surface enhanced Raman spectroscopy) têm recebido atenção na área de biossensores. A ressonância plasmônica de superfície localizada - LSPR (do inglês Localized Surface Plasmon Resonance), que ao serem excitadas em uma superfície de metais nanoestruturados com luz, causa uma intensificação massiva do espalhamento Raman de moléculas na vizinhança da superfície metálica. Este efeito resulta em uma técnica espectroscópica ultrasensível aprimorada, que preserva a complexidade estrutural e flexibilidade experimental da espectroscopia Raman. O SERS está gradualmente se movendo para o campo de aplicações biomédicas viáveis, à medida que avanços impressionantes nas técnicas de instrumentação e nanofabricação permitem a engenharia de nanomateriais plasmônicos² bem ajustados.

Desta forma, apresentamos as principais abordagens estratégicas adotadas para a implementação de sensores SERS e outros meios de diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer nesta revisão. Mostraremos exemplos relevantes e recentes enquanto discutimos as principais vantagens e limitações atuais da técnica.

3.1.1 Câncer de Boca

O carcinoma de células escamosas da cavidade oral ou câncer de boca é um tumor comum no mundo todo. De acordo com INCA (2020), estima-se que no triênio 2020-2022 sejam diagnosticados no Brasil cerca de 11.180 homens e 4.010 mulheres para cada ano do triênio. A maior frequência ocorre na língua, amígdalas, assoalho da boca e gengivas. A idade média das pessoas diagnosticadas com câncer de boca é de 63 anos, sendo ligeiramente mais frequente em pessoas de raça branca do que nas de raças preta e em homens. Ainda no Brasil, a maioria dos casos são diagnosticados em seu estágio avançado, tendo variações regionais significativas tanto na mortalidade quanto na incidência.

Segundo Melo (2018), atualmente, o método mais comum de diagnóstico é através de exames histopatológicos³, que por muitas vezes está limitado a erros inter e intra observador⁴ e de

² É uma área que estuda como o campo eletromagnético pode ser confinado em dimensões de mesmos tamanhos ou menores que o comprimento de onda.

³ Consiste na análise microscópica dos tecidos para a detecção de possíveis lesões existentes, com a finalidade de informar ao clínico a natureza, a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo confirmar a causa da afecção.

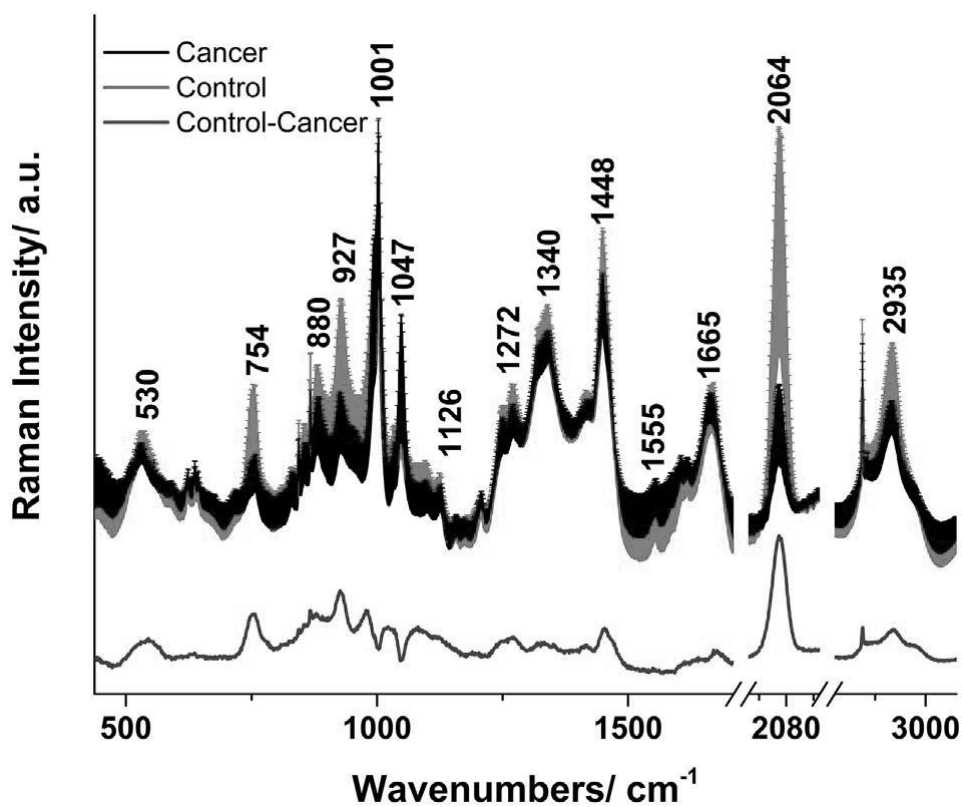
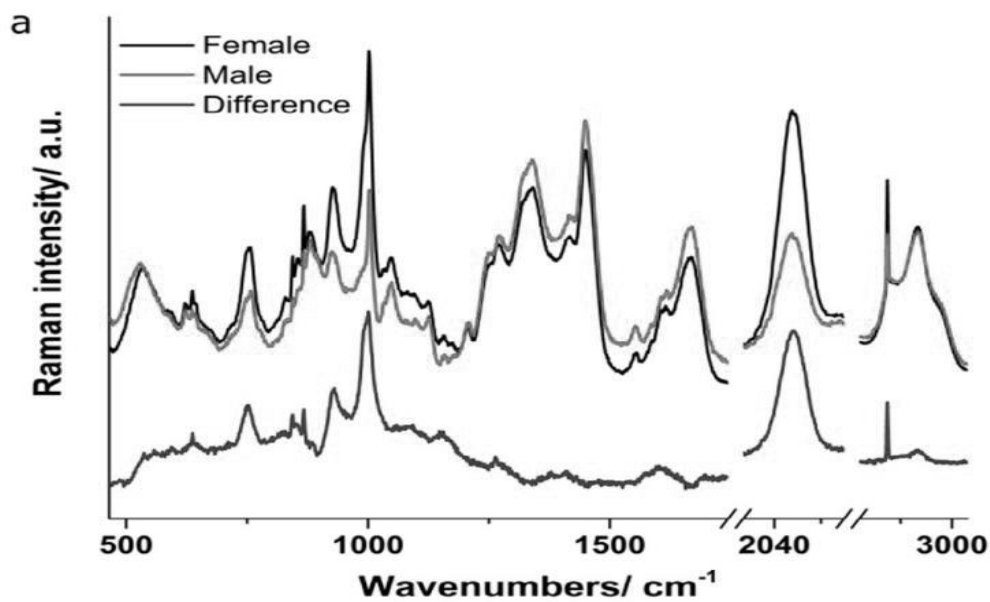
⁴ São erros resultado da falta de clareza do critério da medida, treinamento ou de interpretação.

amostragem. Porém, a técnica de espectroscopia Raman surgiu com um método biofísico, baseado no espalhamento inelástico da luz que pode identificar as impressões digitais bioquímicas de compostos salivares, mostrando-se precisa para o diagnóstico de várias doenças, incluindo câncer oral e câncer de orofaringe, com alta especificidade química.

Falamas *et al.* (2021), recentemente realizou um estudo de diagnóstico de câncer de boca e orofaringe a partir de amostras de saliva usando técnicas micro-Raman e espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Para isso, amostras de saliva foram coletadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer oral e orofaríngeo confirmados patologicamente. A utilização da espectroscopia Raman para diferenciação entre pacientes com câncer de boca e saudável foi possível, através da comparação de suas taxas de classificação. Com base nas diferenças entre os espectros das salivas de pacientes saudáveis e com câncer, várias bandas de biomarcadores foram identificadas. Na figura 4, são apresentados os espectros Raman médios característicos das salivas dos doadores saudáveis do sexo masculino e feminino, juntamente com o espectro que representa a diferença entre eles logo abaixo. Como pode ser observado, os espectros mostraram locais de pico semelhantes, formas e intensidades relativas. Ao olhar mais de perto, várias pequenas diferenças podem ser identificadas, principalmente relacionadas à intensidade relativa do pico, mas também à sua posição. Modificações de localizações de pico foram observadas, por exemplo, para a banda de lisozima em 528 cm^{-1} no espectro Raman de voluntários do sexo masculino, que muda para 533 cm^{-1} no espectro Raman característico de voluntários do sexo feminino. Além disso, a diferença entre os espectros masculinos e femininos revelou várias bandas principais, que podem atuar como potenciais biomarcadores que discriminam as duas classes em 754 , 927 , 1001 e 2064 cm^{-1} .

Figura 3- (a) Média dos espectros micro-Raman característicos dos voluntários saudáveis do sexo feminino e

masculino e o espectro de diferença calculado.



Fonte: Falamas *et al.* 2021.

Assim, com base nas diferenças entre os espectros salivares de pacientes saudáveis e com câncer, várias bandas de biomarcadores puderam ser identificadas. Destacou-se, por exemplo, que

uma banda significativa de biomarcador vibracional em 2064 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao tiocianato, foi observada tanto através da técnica de espectroscopia infravermelho (FT-IR) como espectroscopia Raman. Outras bandas Raman características do câncer foram observadas em 754 cm^{-1} (triptofano), 530 e 927 cm^{-1} (lisozima⁵), 1001 cm^{-1} (fenilalanina⁶), enquanto a banda do biomarcador FT-IR estava localizada em 1075 cm^{-1} (correspondendo ao estiramento das ligações fosfodiéster no DNA, RNA). Portanto, a análise Raman tem a capacidade de detectar modificações biomoleculares relacionadas à presença de lisozima e triptofano em taxas reduzidas das amostras e à fenilalanina que apresenta taxas em níveis mais altos. Portanto, o estudo de Falamas *et al.* mostrou que o câncer de boca e orofaringe podem ser diferenciados a partir da análise da saliva com base em suas respectivas assinaturas espectrais de micro-Raman e FT-IR, devido às modificações biomoleculares induzidas pela doença.

A cirurgia de câncer bucal é difícil, pois se tem a necessidade de buscar o equilíbrio entre manter o máximo de tecido possível, por questões de estética e funcionamento e remover o suficiente do tumor, para que não venha a existir recorrência. Daí a necessidade da utilização da espectroscopia Raman, para discriminar entre o tecido saudável e/ou tecido canceroso.

3.1.2 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais diagnosticado em todo o mundo e também é uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em homens e mulheres. A progressão do CCR é lenta e ocorre frequentemente no cólon, mas o risco aumenta com a idade. A idade é significativa, sendo recomendada a triagem CCR a partir dos 50 anos (Noothalapati *et al.*, 2021).

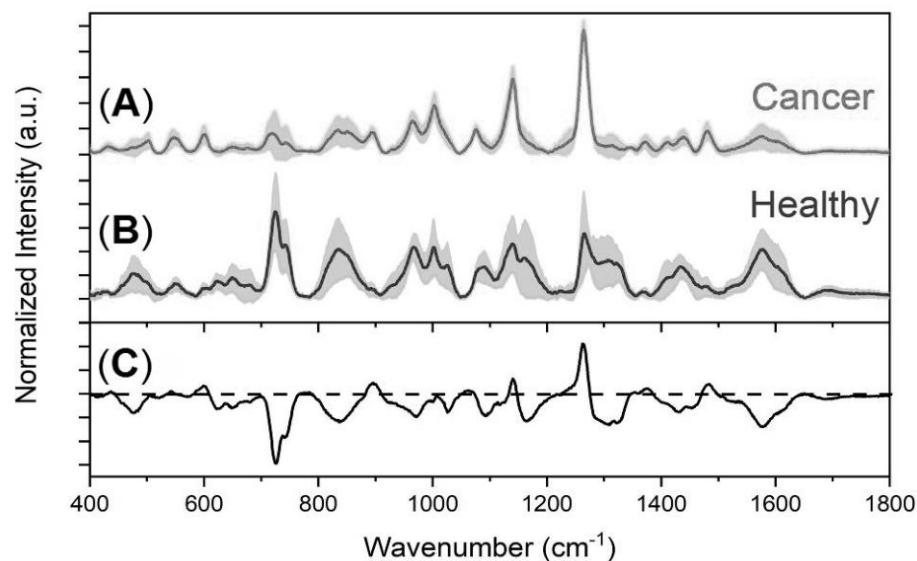
A incidência está concentrada nos países desenvolvidos, embora a taxa esteja aumentando rapidamente nos países em desenvolvimento. A detecção precoce do CCR é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade. Colonoscopia é o método mais utilizado na triagem, embora não seja frequentemente usado devido às considerações práticas, como custos incorridos, falta de pessoal e infraestrutura.

⁵ São proteínas que permitem o bom funcionamento dos olhos e outras mucosas, além de evitar doenças.

⁶ São aminoácidos absorvidos em alimentos, geralmente laticínios e carne, além de ser essencial para o crescimento de células cancerosas.

Para Hong *et al.* (2019), a aplicação do SERS é bastante útil para o diagnóstico rápido de patógenos e estado biológico anormal. E para que os perfis de SERS se tornem mais fortes e estáveis amplificando o seu sinal, deve-se utilizar de um pré-tratamento empregando nanopartículas de ouro misturando-se com o soro de pacientes com câncer colorretal, desta forma, a gota da mistura forma-se uma região na superfície que parece um anel de café na borda. Esses espectros obtidos de pacientes com câncer e voluntários saudáveis quando analisados através da máquina de vetor de suporte - SVM (do inglês, Support Vector Machine), apresentam melhor desempenho na classificação de diagnósticos de CCR do que o modelo PCA (Análise de Componentes Principais), uma técnica de análise multivariada, usada para analisar relações entre um grande número de variáveis. Na figura 6, os espectros SERS de amostras de soro sanguíneo coletadas, mostram um espectro Raman aprimorado com proeminentes sinais (Figura 5A-B). Observa-se, que os espectros de grupos saudáveis e de câncer compartilham várias características comuns do SERS, enquanto existem diferenças particulares entre os dois grupos. Para obter uma visão geral dos espectros, primeiro analisamos a diferença entre espectros médios de grupos saudáveis e com câncer, como mostrado na Figura 5C.

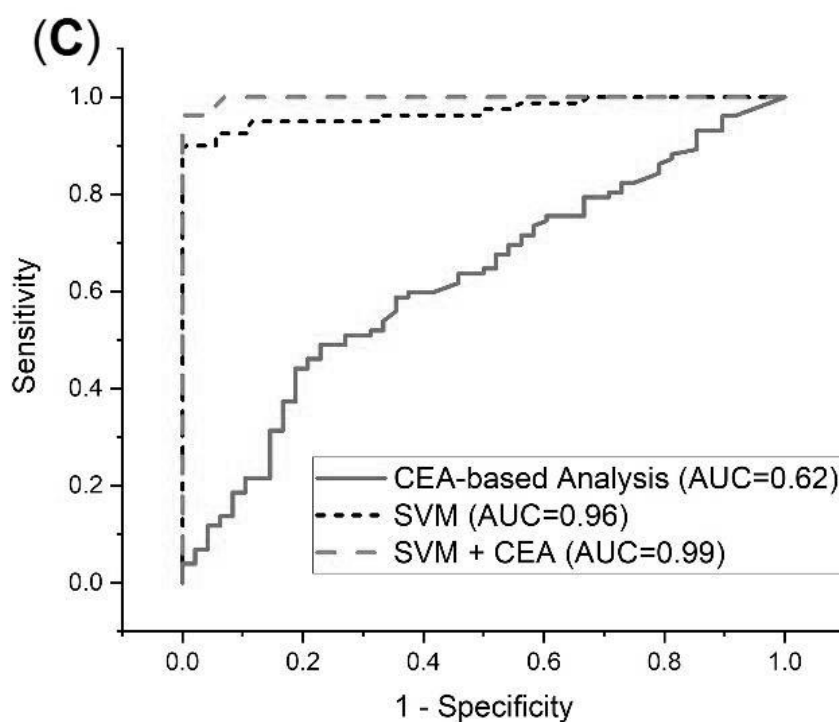
Figura 4 – Espectros SERS médios (linhas sólidas) de amostras de soro sanguíneo do (A) câncer e (B) grupo saudável. A área cinza ilustra a distribuição de todos os espectros no grupo. (C) A intensidade diferença entre os espectros médios em (A) e (B) em função do número de onda.



Fonte: Hong *et al.* 2019.

As figuras 6 e 7, quando justamente analisadas, mostram que devido a limitação da sensibilidade⁷ e especificidade⁸ do CEA (antígeno carcinoembrionário) é necessária uma abordagem sinérgica combinando os sinais de SERS e CEA. Desta forma, notavelmente o modelo alcança desempenho superiores aos demais métodos.

Figura 5 - (C) Curva característica de operação do receptor (ROC) de três tipos de métodos de classificação. Os valores da área sob a curva (AUC) são calculados.



Fonte: Hong *et al.* 2019.

⁷ Corresponde ao percentual de resultados positivos dentre as pessoas que tem uma determinada doença ou condição clínica.

⁸ É a capacidade do mesmo teste ser negativo nos indivíduos que não apresentam a doença que está sendo investigada.

Figura 6 - Parâmetros de previsão de métodos de classificação variados

Classification Method	Parameters		
	Accuracy	Sensitivity	Specificity
SVM	89.8%	87.5%	100%
CEA-based Analysis	54.1%	49.0%	77.1%
SVM + CEA	91.8%	90.0%	100%

Fonte: Hong *et al.* 2019.

Os parâmetros, incluindo precisão e sensibilidade acima de 80% são alcançados através do modelo de previsão empregando a máquina de vetor de suporte (SVM). Além disso, a combinação dos parâmetros SERS e CEA do exame de sangue oferece resultados de previsão aprimorados, aumentando a precisão e a sensibilidade para mais de 90%. Para Hong *et al.* (2019), no futuro, a acumulação contínua de dados do sujeito e a incorporação de outros dados de parâmetros biológicos podem contribuir para a melhoria deste método.

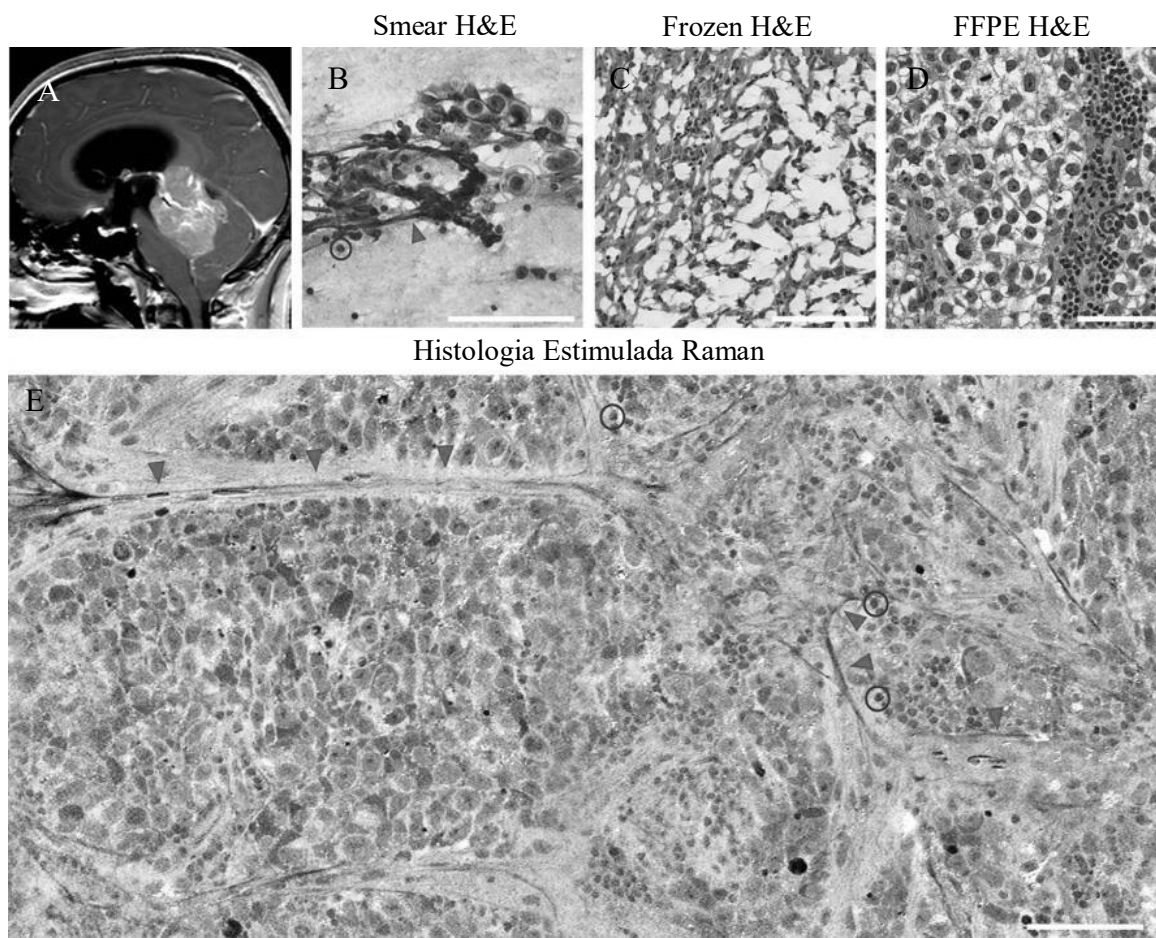
Zheng (2019), ratifica o uso da técnica da ER, onde diz que é uma ferramenta potencialmente útil para futura triagem de CCR que pode ser usada para auxiliar os médicos a tomar decisões rápidas, objetivas e claras. Ele também diz que a técnica tem o potencial de ser bastante precoce na detecção de CCR, que pode ter um impacto significativo, reduzindo a incidência e melhorando as taxas de sobrevivência de câncer colorretal.

3.1.3 Câncer de Cabeça

Para dar o melhor tratamento cirúrgico para tumores cerebrais juvenis, é necessário um diagnóstico histológico preciso. Os procedimentos histológicos intraoperatórios atuais são demorados e trabalhosos e, frequentemente, geram artefatos que dificultam a interpretação. De acordo com Hollon *et al.* (2018), pode-se avaliar a capacidade do SRH (do inglês, stimulated Raman histology) de ser utilizado no diagnóstico intraoperatório de tumores cerebrais do tipo pediátrico. Através da utilização desta técnica foi realizado um estudo para expor as características diagnósticas primárias em tecido fresco obtido a partir de 33 tipos de amostras de tumores cerebrais pediátricos, mantendo a citologia tumoral e a histoarquitetura em todos os espécimes. Em uma simulação de consulta intraoperatória de 25 pacientes, as amostras foram digitalizadas usando SRH

e métodos convencionais histológica com hematoxilina e eosina (H&E)⁹. Um concordância diagnósticas quase perfeitas com precisão de 92% a 96% foram alcançadas com diagnósticos baseados em SRH. Na figura 8, demonstra-se a utilização de alguns desses métodos convencionais e o método SRH.

Figura 7 - A, imagem de ressonância de germinoma (células germinativas) de fossa posterior. B, A preparação SMEAR, mostra as grandes células. C, o corte congelado do germinoma. D, a FFPE H&E mostra grandes células. E, semelhante à imagem FFPE, os principais recursos de diagnóstico são mostrados em SRH.



Fonte: Hollon *et al.* 2018.

No método B, mostra-se as células germinativas com abundante citoplasma espumoso rico

⁹ É a principal coloração em anatomia patológica e provavelmente a mais utilizada em histologia. Permite a visualização de vários constituintes celulares, nomeadamente do núcleo, citoplasma e tecido conjuntivo.

em glicogênio¹⁰ (círculo amarelo), misturado com pequenos linfócitos reativos¹¹ (círculo azul) adjacentes aos vasos sanguíneos (setas vermelhas). No método C, após o congelamento as características citológicas essenciais do germinoma são interrompidas, limitando severamente a interpretação. O D, mostra as grandes células tumorais com nucléolos proeminentes e linfócitos maduros adjacentes aos vasos sanguíneos (setas vermelhas). No método E (SRH), o diagnóstico é mostrado com citologia de espécime preservada e histoarquitetura, permitindo interpretação sem impedimentos e diagnóstico histopatológico preciso.

Como resultado, uma abordagem histológica quantitativa baseada na extração rápida de características de imagem foi criada utilizando imagens de SRH. Usando recursos de imagem SRH, o modelo classificou corretamente 25 tipos de cirurgias pediátricas frescas amostras em tecido normal versus tecido lesionado e de baixo grau versus tecido tumores de alto grau com 100% de precisão. As descobertas mostram como o SRH pode fornecer dados histológicos de diagnóstico rápido que podem ajudar na terapia cirúrgica de tumores cerebrais pediátricos.

3.1.4 Câncer de Pulmão

A detecção precoce e o tratamento do câncer de pulmão são fundamentais para melhorar as taxas de sobrevivência dos pacientes com câncer. No entanto, métodos de detecção reais, como tomografia por emissão de pósitrons (PET)¹² e tomografia computadorizada (TC) têm limitações significativas que afetam sua capacidade de diagnóstico e eficácia no tratamento do câncer de pulmão. Como resultado, há uma necessidade urgente de um relatório rápido, preciso, com preços razoáveis e método de detecção de câncer de pulmão que seja não invasivo.

Park *et al.* (2017), mostram em seu estudo, que devido ao papel dos exossomos¹³ como uma carga para a comunicação intercelular, particularmente na metástase do câncer, evidências de que os exossomos podem ser usados como um indicador não invasivo de câncer. No entanto, a obtenção de resultados confiáveis permaneceu difícil devido à exigência de um processo de

¹⁰ Polissacarídeo ($C_6H_{10}O_5$)_n é formado a partir de moléculas de glicose, utilizado como reserva energética e abundante nas células hepáticas e musculares.

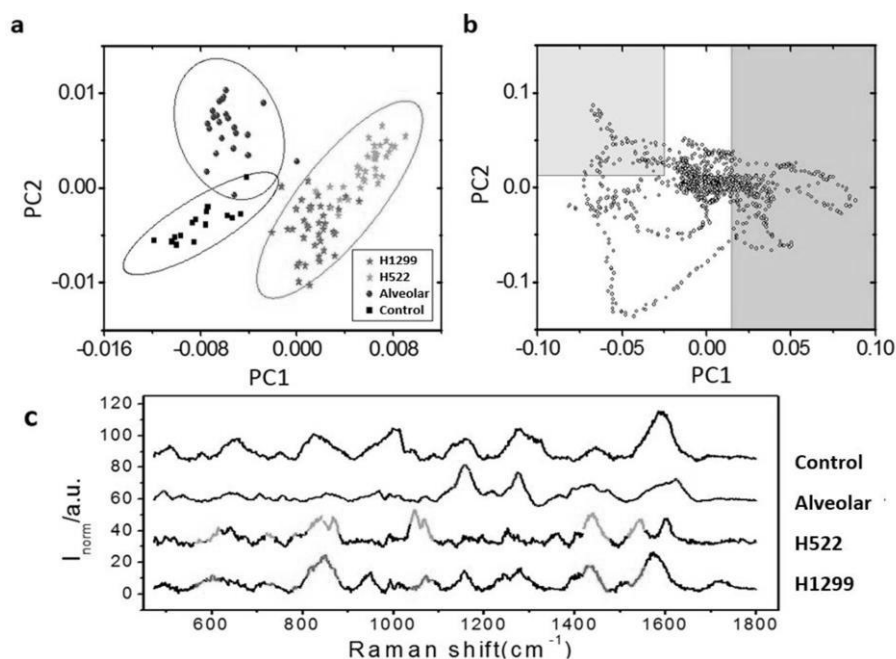
¹¹ Os linfócitos reativos ou atípicos são linfócitos B ativados que reagem contra vírus produzindo anticorpos contra os vírus. No hemograma também é comum leucopenias, trombocitopenias em diferentes graus.

¹² É um exame de diagnóstico por imagem capaz de detectar tumores em todos os lugares do corpo. A sigla PET vem do inglês e significa "tomografia por emissão de pósitrons" (partícula radioativa).

¹³ É a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas. É sintetizada exclusivamente no fígado e possui funções importantes no organismo, como transporte de diversas substâncias e manutenção da pressão oncótica.

rotulagem em altas temperaturas. Desta forma, o espalhamento Raman amplificado por superfície (SERS) combinado com o método de classificação de exossomos altamente sensível e sem rótulos, demonstrou em suas análises estatísticas, padrões diferentes de posições de pico e amplitudes do espectro através das principais análises de componentes (PCA). Na figura 9, mostra as principais análises de componentes (PCA) de conjunto de dados de exossomos, através de suas dispersões distinguindo suas sensibilidades e especificidades.

Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) de conjuntos de dados de exossomos. (a) Gráfico de dispersão do componente principal com agrupamentos coloridos de controle. (b) Componentes principais do resultado do PCA. (c) Os picos Raman relacionados com cada célula alcançada por PCA são mostrados no gráfico com cores 40 linhas



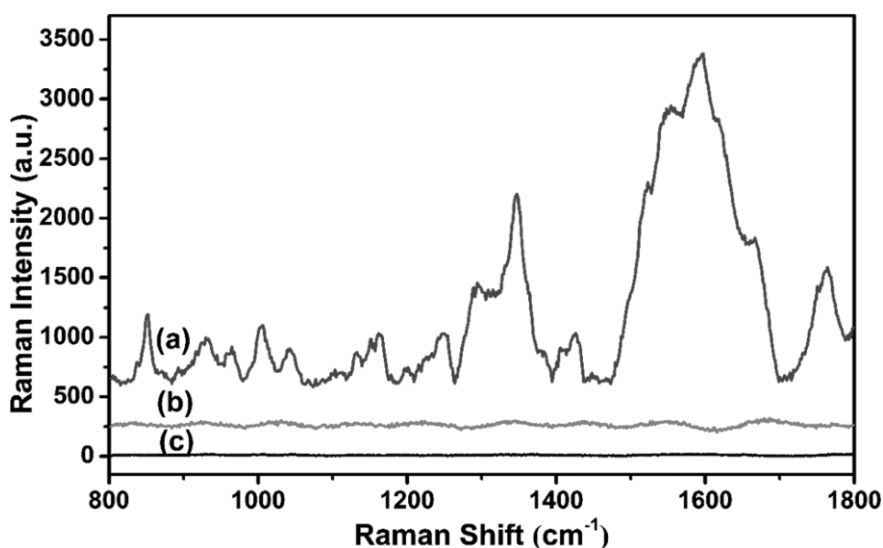
Fonte: Park *et al.* 2017.

Esta análise de padrão distinguiu claramente exossomos derivados de células de câncer de pulmão de exossomos derivados de células normais com 95,3% de sensibilidade e 97,3% de especificidade, como exposto na figura 9(a). Além disso, com base nos resultados da PCA, pode-se concluir que essa diferença foi causada por diferentes sinais SERS de exossomos derivados de células de câncer de pulmão. Na figura 9(b), a cor em Vermelho na área, indica os deslocamentos Raman relacionados com exossomos derivados e a região azul indica os deslocamentos Raman relacionados com exossomos derivados de células alveolares. Na figura 9(c), compara as células de controle e células alveolares derivadas do exossomos com os exossomos derivados de células

de câncer de pulmão H1299 e H522. Essa descoberta abriu caminho para novos métodos de diagnóstico e classificação de câncer de pulmão em tempo real que usam exossomos como marcadores de câncer.

Zhang *et al* (2019), em seu recente estudo utilizou nanopartículas de prata (AgNPs) adicionadas à superfície das fatias pulmonares para melhorar os sinais Raman das biomoléculas. Segundo o autor, o SERS possui uma ampla gama de aplicações em biomedicina, particularmente na detecção de sangue tumoral. E que apesar da espectroscopia Raman poder detectar câncer de pulmão através de fatias teciduais, suas falhas transversais são problemáticas. Sendo assim, a distribuição do campo eletromagnético das AgNPs preparadas foi simulada usando o software COMSOL. O SERS revelou diferenças nas moléculas bioquímicas entre tecidos pulmonares normais ($n = 23$) e cancerosos ($n = 23$) como exposto na Figura 10.

Figura 9 - a) SERS da amostra de fatia de tecido, coberta com AgNPs, de um paciente com câncer de pulmão. (b) Espectro Raman da mesma fatia de tecido amostra sem AgNPs. (c) o sinal Raman de AgNPs



Fonte: Zhang *et al.* 2019.

Na Figura 10(a) mostra alguns SERS fortes enquanto no 10(b) são fracos. Sugerindo que as bandas de Raman foram significativamente aprimoradas pela adição de AgNPs a superfície da amostra. Na Figura 10(c), não há pico Raman, indicando que a AgNPs são relativamente puros e não afetam o sinal da amostra. A sensibilidade e especificidade foram de 95,7% e 95,7%, respectivamente. Esses resultados mostraram que a análise SERS de fatia de tecido pode ser de grande importância para a detecção sem rótulo e rastreamento do câncer de pulmão.

3.1.5 Câncer de Tireóide

Segundo Siegel *et al.* (2016), foram estimados 56.870 novos casos de câncer de tireoide (CT) nos Estados Unidos apenas em 2016. A CAAF (citologia aspirativa por agulha fina) é o método mais confiável, preciso e de baixo custo para a pesquisa inicial de tireoidianos. Porém, o CAAF é limitado por sua incapacidade de diagnosticar com precisão a malignidade em lesões foliculares e, como resultado, 20 a 30 por cento dos casos são classificados como citologicamente indeterminados, evidenciando uma falha do procedimento. Então, a partir de um estudo com a técnica de espectroscopia Raman, os resultados mostraram-se promissores na detecção de uma variedade de cânceres. De acordo com O’Dea *et al.* (2018), as diferenças na composição de ácidos nucleicos, lipoproteínas, carboidratos e proteínas em células benignas e cancerosas são atribuídas através de picos provisórios de bandas Raman, identificadas por análise de variação espectral. Estas diferenças espectrais separam as duas linhagens celulares, através da sensibilidade e especificidade como consta através da Tabela 2.

Tabela 2 - Desempenho do modelo de classificação da linha celular folicular benigna da tireoide das linhagens celulares TC agrupadas por subtipo TC.

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Carcinoma Papilífero de Tireóide (PTC)	85	79	82
Carcinoma Medular da Tireóide (MTC)	84	93	89
Carcinoma Indiferenciado (UTC)	77	65	71
Carcinoma Diferenciados de Tireóide (DTC)	74	74	74

Fonte: O’Dea *et al.* 2018.

Tendo como resultado a sensibilidade (74-85%), especificidade (65-93%) e acurácia diagnóstica (71-89%) foram todos alcançados para identificação de CT. Esses achados sugerem que a espectroscopia Raman tem potencial para diagnóstico pré-operatório de CT na amostra de CAAF.

Para Sbroscia *et al.* (2020), a incidência do câncer de tireoide humana aumentou

significativamente nos últimos 50 anos. Isto é acompanhado por um aumento ainda maior da cirurgia, porque, de acordo com as diretrizes internacionais, os pacientes são por vezes encaminhados para cirurgia quando uma aspiração fina resulta em um diagnóstico citológico indeterminado. Na realidade, apenas 30% das tireoides removidas para diagnósticos têm malignidade cirúrgica, implicando que aproximadamente 70% dos pacientes tiveram remoção desnecessária. Assim, a espectroscopia Raman de tecidos de tireoide se mostra como meio de diagnóstico confiável de câncer. A técnica consegue diferenciar entre tecido saudável e canceroso com uma precisão de 90%. Esses resultados sugerem que a espectroscopia Raman pode ser capaz de exceder os limites diagnósticos atuais.

3.1.6 Câncer de Mama

O câncer de mama tornou-se um grande problema de saúde pública, sendo também o tumor maligno mais comum em mulheres em todo o mundo. Muitos pacientes com câncer de mama são diagnosticados em estágio avançado, resultando em uma baixa taxa de sobrevivência. Como resultado, a detecção precoce e a triagem melhorarão drasticamente as taxas de sobrevivência e reduzirão as complicações em pacientes com câncer de mama. Atualmente, existem muitos métodos clínicos para detectar o câncer de mama, incluindo mamografia de raios X, ressonância magnética (RM), tomografia por emissão de pósitron (PET) e ultrassonografia. Entre estes, a mamografia de raios-X continua a ser o principal método de rastreio do cancro da mama. No entanto, a baixa especificidade da tecnologia de raios X, bem como a dificuldade em detectar tumores minúsculos (menos de 7,5 mm), limitam outras aplicações para o rastreamento do câncer de mama no diagnóstico clínico. Além disso, embora a biópsia ainda seja o método padrão-ouro para o diagnóstico de câncer de mama, sua sensibilidade e especificidade são baixas, particularmente em pacientes com câncer de mama de alto risco com múltiplas lesões suspeitas.

Para Lin *et al.* (2021), o espalhamento Raman aprimorado por superfície (SERS), surgiu com uma tecnologia ultrasensível e não invasiva bem conhecida para aplicações biomédicas, incluindo DNA/RNA, proteína e detecção de sangue para células, através de um método rápido e urgentemente necessário em aplicações clínicas. Em seu estudo utilizando a proteína sérica¹⁵ que

¹⁵ É a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas. É sintetizada exclusivamente no fígado e possui funções importantes no organismo, como transporte de diversas substâncias e

é comumente usada para avaliar a gravidade do câncer, bem como a progressão e o prognóstico foi combinado com a tecnologia de espectroscopia Raman aprimorada por superfície (SERS) para detectar câncer de mama. As proteínas do soro humano foram extraídas usando a membrana de acetato de celulose (AC) de 30 pacientes com câncer de mama e 45 voluntárias saudáveis, e as proteínas extraídas foram misturadas com nanopartículas de prata para medição de SERS. Além disso, foram avaliados principalmente o uso de várias razões de mistura de nanopartículas de proteína-prata (Ag NPs) para gerar o sinal SERS máximo para detecção de amostras clínicas. Para analisar os espectros de proteínas séricas SERS obtidos e estabelecer o modelo de diagnóstico, foram utilizadas duas análises estatísticas multivariadas, análise de componentes principais - análise discriminante linear (PCA-LDA) e máquinas de vetores de suporte parcial mínimo quadrado (PLS-SVM) que é um modelo de calibração multivariada, onde se utiliza da informação do espectro inteiro para construção de dados, relacionado à propriedade de interesse como consta na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação do desempenho diagnóstico do PCA-LDA e PLS-SVM.

Diagnóstico	Espécies Previstas		Acurácia	Sensibilidade	Especificidade	
		Positivo				Negativo
PCA_LDA	Câncer de Mama	26	4	84%	86,67%	82,22%
	Normal	37	8			
PLS-SVM	Câncer de Mama	27	3	94,67%	90%	97,78%
	Normal	44	1			

Fonte: Lin *et al.* 2021.

Os resultados mostram que o modelo PLS-SVM supera o modelo PCA-LDA na classificação do diagnóstico de câncer de mama, devido ao fato de que o SVM pode mapear os dados de amostra em um espaço de recurso dimensional mais alto para linearizar (tornar reto) os limites do conjunto amostral. Esse resultado ainda indicou que a tecnologia SERS de proteína

manutenção da pressão oncótica.

sérica combinando ao algoritmo de diagnóstico PLS-SVM tem potencial como um método rápido e método diagnóstico não invasivo para rastreamento do câncer de mama.

Na amostra, foi obtido através do modelo PLS-SVM, uma melhor diferença diagnóstica entre o câncer e o grupo controle, com uma precisão diagnóstica de 94,67%, tendo o melhor desempenho na classificação do câncer de mama, com um alto potencial para o diagnóstico.

Em outro estudo, Fallahzadeh (2018), tentou melhorar a precisão da detecção de câncer baseada em Raman, identificando os melhores recursos Raman usando o algoritmo ACO¹⁷. Foi usado um sistema micro-Raman de 785 nm para medir 49 espectros de amostras de tecido mamário normal, benigno e canceroso no estudo atual. Após a remoção de ruído e fluorescência de fundo, a intensidade de 12 bandas Raman de amostras biológicas foram extraídas como características de cada espectro. O algoritmo ACO foi então utilizado para determinar as melhores características para o diagnóstico. Na tabela 4 consta a demonstração de características sem e com a aplicação do algoritmo ACO.

Tabela 4 - Demonstração das bandas características

I	C	N	B		II	C	N	B	
C	14	2	1	0,823	C	16	0	1	0,941
N	7	5	2	0,357	N	3	11	0	0,785
B	0	1	17	0,944	B	1	1	16	0,888
	0,666	0,625	0,850	0,734		0,800	0,916	0,941	0,877

Fonte: Fallahzadeh, 2018.

No primeiro estado (sem ACO), a acurácia do diagnóstico foi de 0,73. No estado II com aplicação do algoritmo ACO, a precisão do diagnóstico aumentou para 0,87. Portanto, percebe-se que a precisão do diagnóstico aumentou 14%. Sendo assim, a seleção de recursos ACO pode melhorar a precisão do diagnóstico de modelos de diagnóstico baseados em Raman.

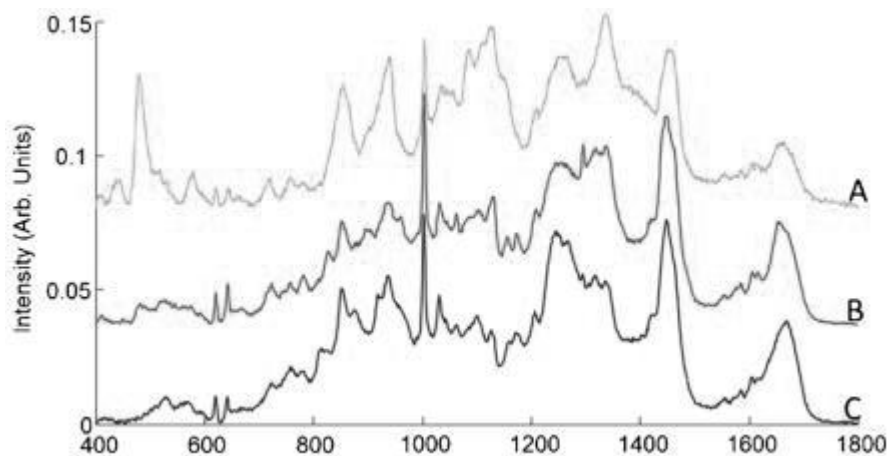
3.1.7 Câncer do Colo de Útero

¹⁷ A otimização de colônias de formigas (ACO) é um método que é usado para encontrar o melhor caminho em um gráfico ponderado usando formigas artificiais.

O câncer do colo do útero é o quarto câncer mais comum em mulheres em todo mundo, tendo uma estimativa, segundo o INCA (2020), que no triênio 2020-2022 sejam diagnosticados no Brasil cerca de 16.590 casos e que afeta principalmente mulheres mais jovens.

Segundo Lyng FM *et al.* (2015), atualmente, os principais métodos para a detecção prévia do câncer incluem a citopatologia, teste de HPV e histopatologia, os quais são limitados em termos de subjetividade, custo e tempo. Isso porque, o diagnóstico é baseado em diferenças visuais na aparência do tecido, que é auxiliada na histopatologia e citologia modernas por corantes ópticos e tecnologia de microscópio. Já a espectroscopia Raman fornece uma assinatura ou impressão digital da amostra biológica, com base nos constituintes bioquímicos onde mudanças sutis na composição associada à doença podem ser identificadas com alta sensibilidade com o auxílio de análise estatística multivariada. Como a tecnologia óptica, pode ser aplicada microscopicamente ou endoscopicamente, para aplicações ex-vivo ou in-vivo, as primeiras incluindo citopatologia ou histopatologia. A microespectroscopia Raman tem sido usada para distinguir entre queratinócitos humanos primários – PHK (do inglês, primary human keratinocytes), células PHK que expressam o gene E7 de HPV16 (PHK E7) e células de câncer cervical que expressam HPV16 (CaSki). Usando principal análise de componentes (PCA), a espectroscopia Raman discrimina entre células PHK e CaSki com uma sensibilidade de 93% e especificidade de 93%, e entre Células PHK e PHK E7 com sensibilidade de 93% e especificidade de 80%.

Figura 10 - média dos espectros Raman de cada camada representativa



Fonte: Lyng FM *et al.* 2015.

As bandas Raman mais distintas em espectro azul pode ser atribuído ao colágeno um componente importante da camada de tecido conjuntivo ou estroma. O espectro vermelho mostra bandas distintas devido a bases de DNA, adenina (722 cm^{-1}), timina (755 cm^{-1}) e citosina (782 cm^{-1}), e o espectro verde mostra bandas em 480 cm^{-1} , 849 cm^{-1} e 938 cm^{-1} , indicando o acúmulo de glicogênio na camada intermediária/superficial.

Ainda, conforme Lyng FM *et al.* (2015), a principal vantagem das técnicas baseadas em espectroscopia é que, uma vez estabelecida, a técnica é completamente objetiva, baseada na doença e/ou nas alterações relacionadas à etiologia da doença nas assinaturas bioquímicas, em vez de depender da interpretação especializada das alterações morfológicas e que isso deve minimizar o risco de erros de diagnóstico resultantes de variações na interpretação humana subjetiva. A análise rápida também deve resultar em uma rápida reviravolta para minimizar a ansiedade do paciente.

3.1.8 Câncer de Intestino

O câncer de intestino, conforme a OMS é o quarto câncer mais incidente em todo mundo, tendo uma estimativa, segundo o INCA (2020), que no triênio 2020-2022 sejam diagnosticados no Brasil cerca de 13360 em homens e 7870 em mulheres.

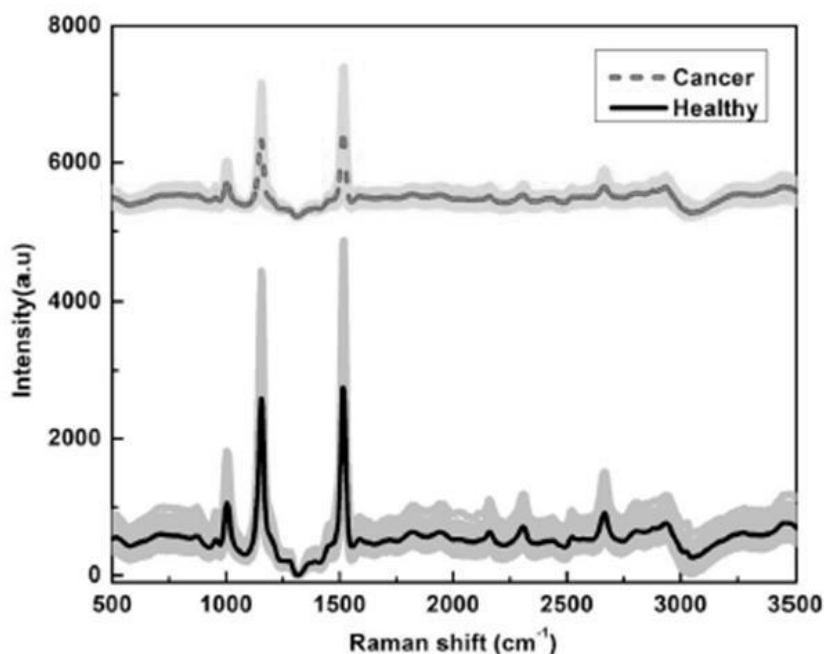
Maryam Bahreini *et al.* (2019), utiliza a espectroscopia Raman para a análise e discriminação de soro sanguíneo de indivíduos saudáveis e com câncer gástrico. Segundo Maryam Bahreinia, *et al.*, atualmente, o diagnóstico realizado para detecção do câncer de intestino é através de material coletado durante endoscopia e examinado em laboratório, tornando-se um processo demorado.

Maryam Bahreinia *et al.*, relata que a espectroscopia Raman é uma ferramenta potencial para sondar componentes do sangue devido às suas medições em tempo real e caráter não destrutivo, sem a necessidade de reagentes adicionais.

Para Maryam Bahreinia *et al.*, se o câncer gástrico afetar os componentes do sangue, a análise de sangue pode ser usada para diagnóstico e triagem dessa doença prejudicial e a taxa de mortalidade em pacientes reduziria significativamente. Dessa forma, ao correlacionarem testes realizados de forma enzimática, através da espectroscopia Raman, os resultados revelam que para todos os componentes do soro, os coeficientes de correlação entre os espectros Raman e dos testes

enzimáticos estão acima de 94% de forma significativa e, que os resultados de discriminação de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer gástrico mostram que $87,5 \pm 2,5\%$ dos indivíduos saudáveis e com câncer gástrico são diagnosticados adequadamente, conforme a Figura 12.

Figura 11 - As curvas de sombra dos espectros Raman de câncer gástrico e saudável. As curvas de sombra mostram os espectros Raman de todos os saudáveis ($n = 40$) e câncer gástrico ($n=20$) indivíduos que são separados por um deslocamento. O espectro médio de pessoas saudáveis é mostrado com uma curva preta (inferior) e paciente com câncer gástrico com uma curva tracejada vermelha (superior).



Fonte: Maryam Bahreini *et al.* 2019.

Assim, os resultados mostraram que a espectroscopia Raman pode ser um método eficaz para distinguir as amostras de soro de indivíduos saudáveis e com câncer gástrico, podendo ser explorada como uma ferramenta potencial de triagem para câncer gástrico em um futuro próximo. Além disso, os resultados apresentados comprovam a utilidade da metodologia desenvolvida para o rastreamento do câncer gástrico.

3.1.9 Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago é um câncer comum no tubo digestivo, e que está aumentando cada

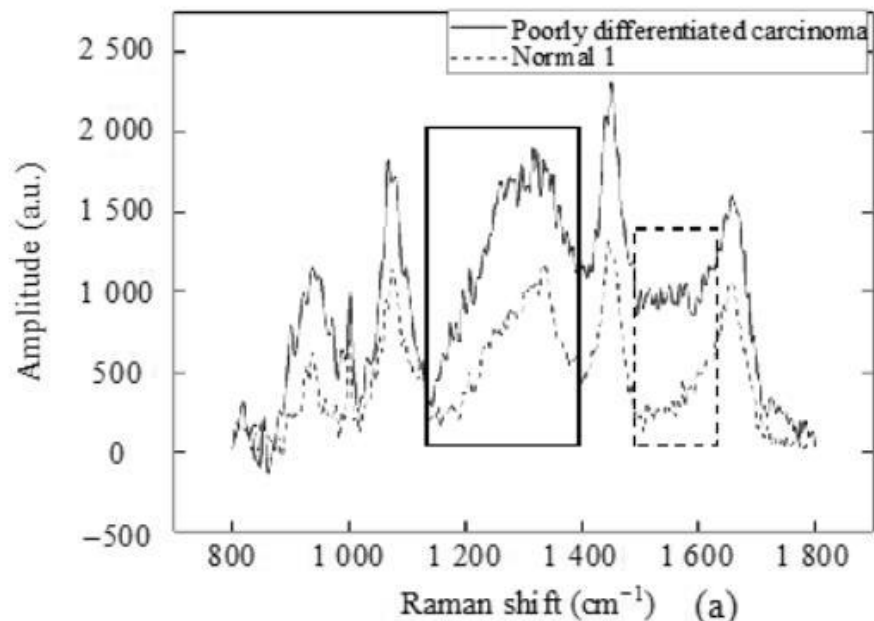
vez mais em incidência e mortalidade.

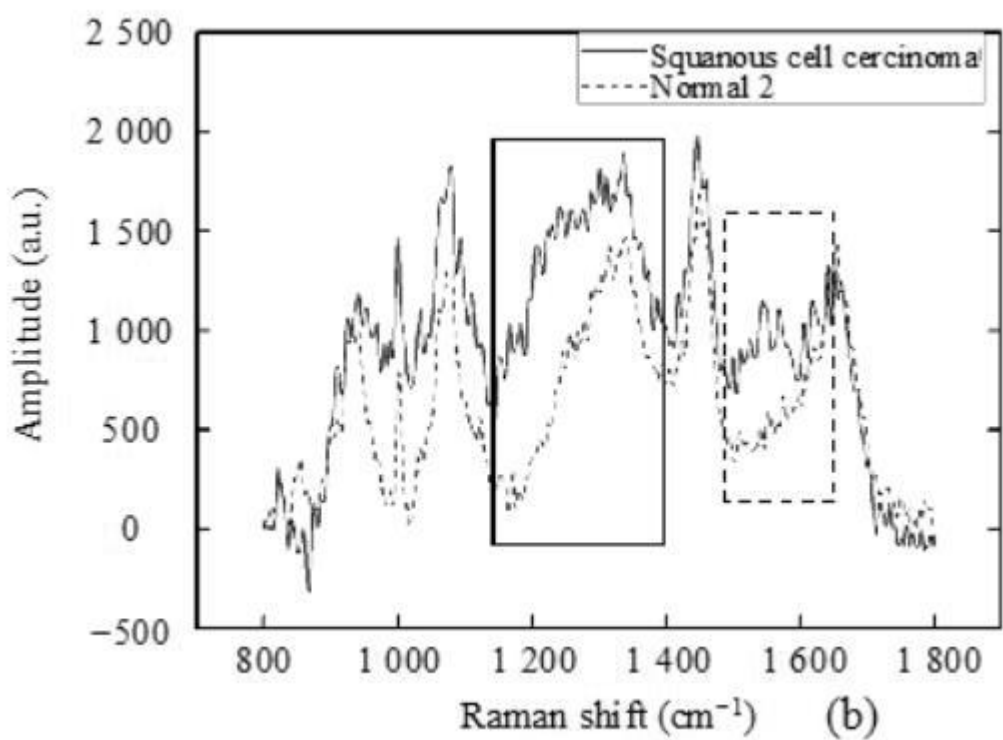
Segundo Dai J *et al.* (2019) os métodos convencionais de diagnósticos baseiam-se principalmente no endoscópico, o qual depende muito da avaliação visual das estruturas e alterações morfológicas da superfície do tecido, o que resulta em baixa precisão diagnóstica, sendo necessário, para o diagnóstico final, a realização de biópsia dos tecidos coletados.

A fim de diferenciar de forma eficaz os tecidos normais e de câncer de esôfago, Dai J *et al.*, utilizaram-se de um método baseado no rastreamento da largura a meia altura (FWHM) dos picos Raman e a intensidade relativa em diferentes bandas, onde os dados foram coletados por um sistema de sensor de espectro Raman de fibra óptica durante exame clínico endoscópico.

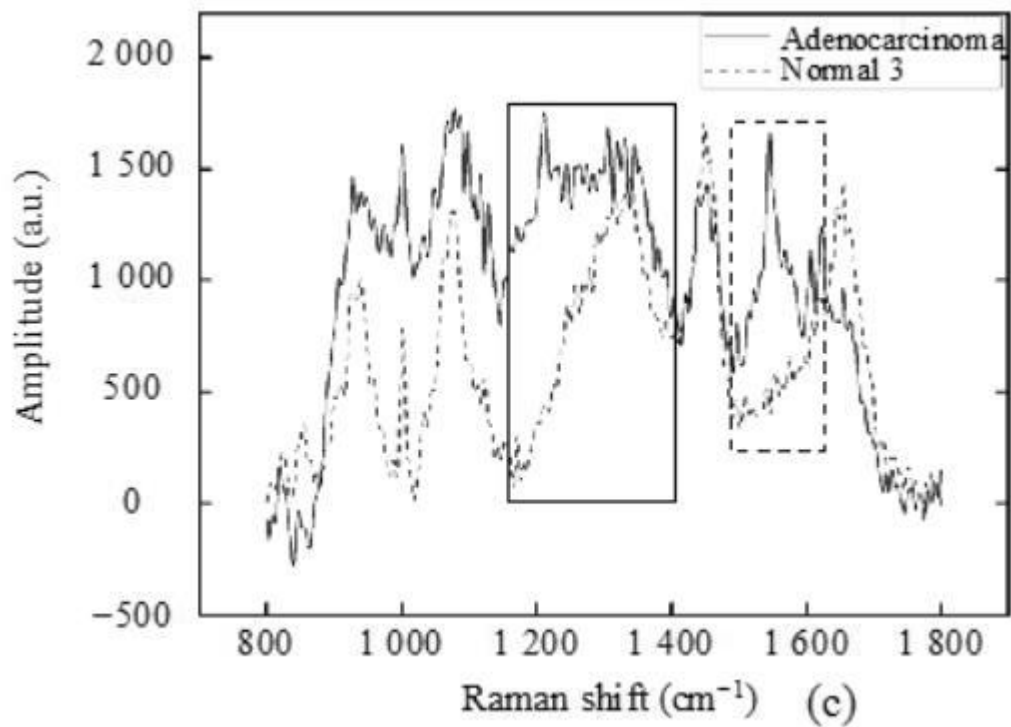
Conforme Dai J *et al.*, o espectro Raman dos tecidos é obtido em 1 segundo pela combinação do sistema de detecção de espectro Raman de fibra óptica de alto desempenho e tecnologia de processamento de filtragem de sinal. Ressalta, que o método de análise proposto baseado em FWHMs e intensidade relativa dos picos pode diferenciar os tecidos normais e patológicos de forma eficaz, dessa forma, espera-se que o método proposto possa ser utilizado para solucionar o problema do diagnóstico clínico, de forma rápida e precisa, conforme a figura 13.

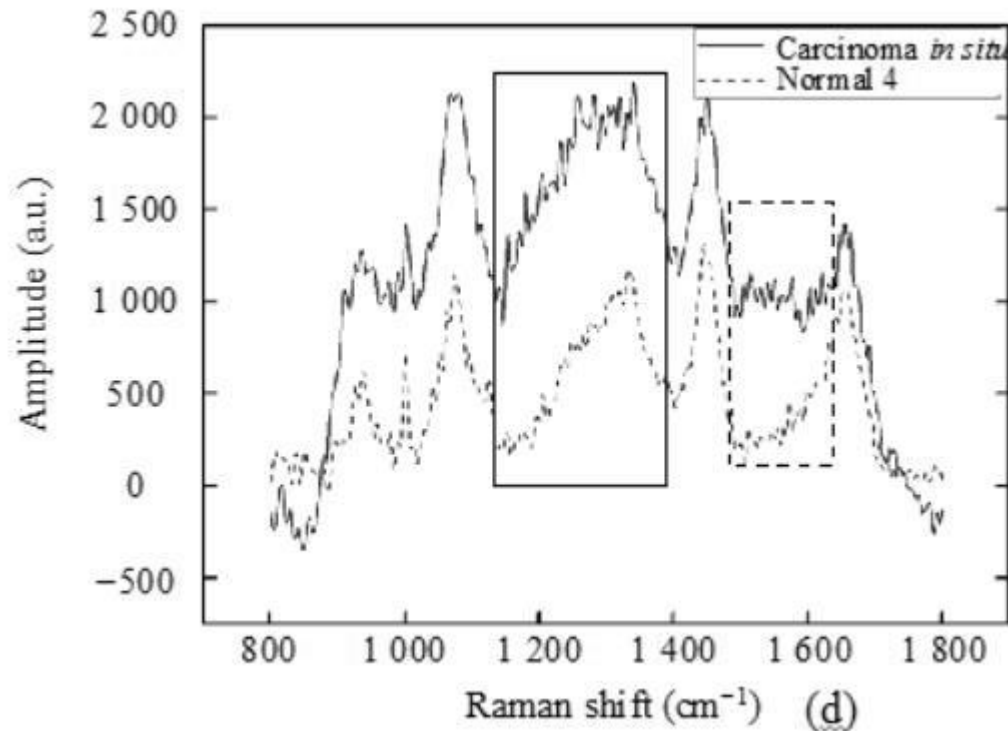
Figura 12 – Espectros Raman de (a) carcinoma pouco diferenciado e tecidos normais, (b) carcinoma de células escamosas e tecidos normais, (c) adenocarcinoma e tecidos normais, e (d) carcinoma in situ e tecidos normais.





Fonte:





Dai J, *et al.* 2019.

As Figuras 13(a) a 13(d) mostram os espectros Raman de carcinoma pouco diferenciados e tecidos normais, carcinoma de células escamosas e tecidos normais, adenocarcinoma e tecidos normais, carcinoma *in situ* e tecidos normais, respectivamente. Em cada figura, cada espectro é o espectro médio dos mesmos tipos de tecidos. Existem duas diferenças evidentes entre o espectro do carcinoma e o espectro do tecido normal. A primeira diferença (no retângulo de linha contínua), em comparação com o espectro de tecidos normais, é observada na faixa de 1100 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} do espectro do espectro, onde os tecidos de carcinoma têm um apresentam uma banda mais larga nessa região. Por outro lado, as intensidades dos picos do espectro do carcinoma são superiores as intensidades observadas nos espectros de tecidos normais.

3.1.10 Câncer de Ovário

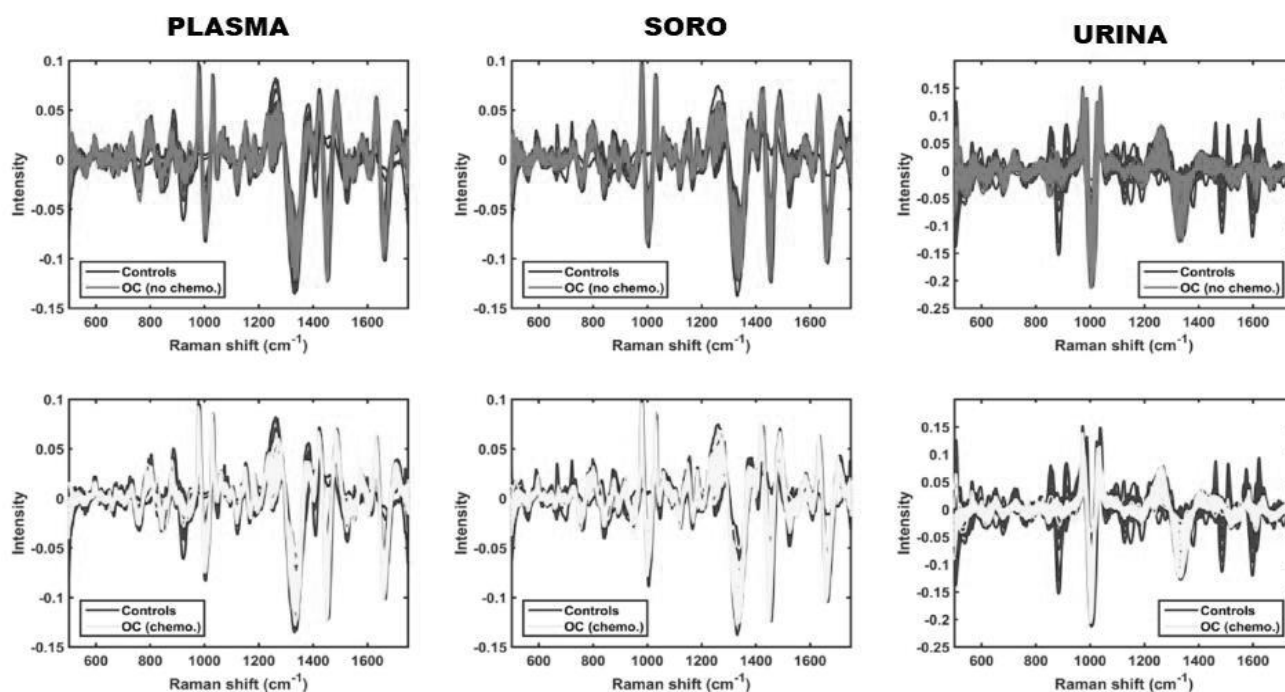
O câncer de ovário, segundo o INCA (2020), é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, atrás apenas do câncer do colo do útero. A quase totalidade das neoplasias ovarianas (95%) é derivada das células epiteliais (aquelas que revestem o ovário). O restante provém de células germinativas (aquelas que formam os óvulos) e células estromais (que produzem a maior parte dos

hormônios femininos). Estima-se é que no triênio 2020-2022 sejam diagnosticados no Brasil cerca de 6.650 casos.

Segundo Giamougiannis P *et al.* (2021), não existe nenhum teste “padrão ouro” para triagem ou diagnóstico de câncer de ovário e que o uso do antígeno cancerígeno CA125, o marcador mais comumente utilizado, pode também ter seus níveis elevados em muitas condições benignas, como por exemplo; cistos, miomas, endometriose e adnomiose. Além disso, as técnicas de imagem mais avançadas, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, são caras, demoradas e muitas vezes associadas ao aumento do desconforto do paciente.

Dessa forma, Giamougiannis P *et al.* (2021), a fim de desenvolverem técnicas para aprimorar o diagnóstico, utilizaram-se da espectroscopia Raman para identificar o potencial do plasma, soro e urina para o diagnóstico de câncer de ovário, onde realizaram uma análise comparativa entre os biofluidos (plasma e soro) e a urina. Para tanto, foram coletadas amostras de pacientes com câncer assim como de pacientes com condições ginecológicas benignas, conforme a Figura 14.

Figura 13 – Espectros pré-processados de classes de câncer de ovário versus todos os controles benignos para plasma, soro e urina. Principais gráficos: câncer de ovário sem quimioterapia (OC sem quimioterapia) versus controles. Gráficos inferiores: cânceres de ovário NACT (químio OC) versus controles. CO, cânceres do ovário; quimioterapia, quimioterapia; NACT, quimioterapia neoadjuvante



Fonte: Giamougiannis P *et al.* 2021.

Os picos espectrais dispostos na Figura 14, representam classificadores moleculares entre diferentes grupos, e sua intensidade indica a magnitude das diferenças entre classes para um biomarcador específico, o CA125. No plasma e no soro, a maioria das intensidades de absorvância “fortes” em comparações entre câncer de ovário sem quimioterapia e controles podem ser alocados para componentes estruturais de mucinas, que pertencem à família das glicoproteínas. Mais especificamente, picos observados em número de onda aproximados 880, 950, 1000, 1380, 1600 e 1680 cm^{-1} podem ser atribuídos a porções de carboidratos (como galactoseamina, glucosamina, galactose) ou aminoácidos (como serina, treonina) que são ricos em mucinas. Já na urina, métricas estatísticas para diagnóstico de câncer de ovário no grupo sem quimioterapia foram menores em comparação com os biofluidos derivados do sangue. Isso pode ser atribuído a absorvâncias mais fracas observadas em bandas alocadas para mucinas e se correlaciona com a urina com baixa concentração de CA125, com diferenças médias muito menores entre pacientes com câncer de ovário e com benignas condições ginecológicas do que as presentes no sangue.

Giamougiannis P *et al.* (2021), em conclusão, relata que os três componentes biológicos examinados exibiram potencial para identificar alterações espectroquímicas relacionadas à quimioterapia e que no plasma e no soro podem ser parcialmente atribuídos a níveis variados do marcador tumoral CA125.

3.1.11 Câncer de Pele

De acordo com o INCA (2020), o câncer de pele melanoma é mais frequente em adultos brancos. Nos indivíduos de pele negra, ele é mais comum nas áreas claras, como palmas das mãos e plantas dos pés. É o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, tendo um bom prognóstico se detectado em sua fase inicial.

Feng X *et al.* (2018), em busca de marcadores biofísicos para o diagnóstico do câncer de pele, utilizam-se da espectroscopia Raman, tendo em vista que o método, já utilizado em estudos anteriores, é altamente sensível na diferenciação entre melanoma maligno (MM) – versão mais letal do câncer de pele – de lesão pigmentada benigna, porém, esses estudos empregaram classificadores estatísticos para descreverem as diferenças espectrais entre as patologias, ou seja, não fornecem informações sobre os biomarcadores de câncer mais relevantes. Dessa forma, Feng

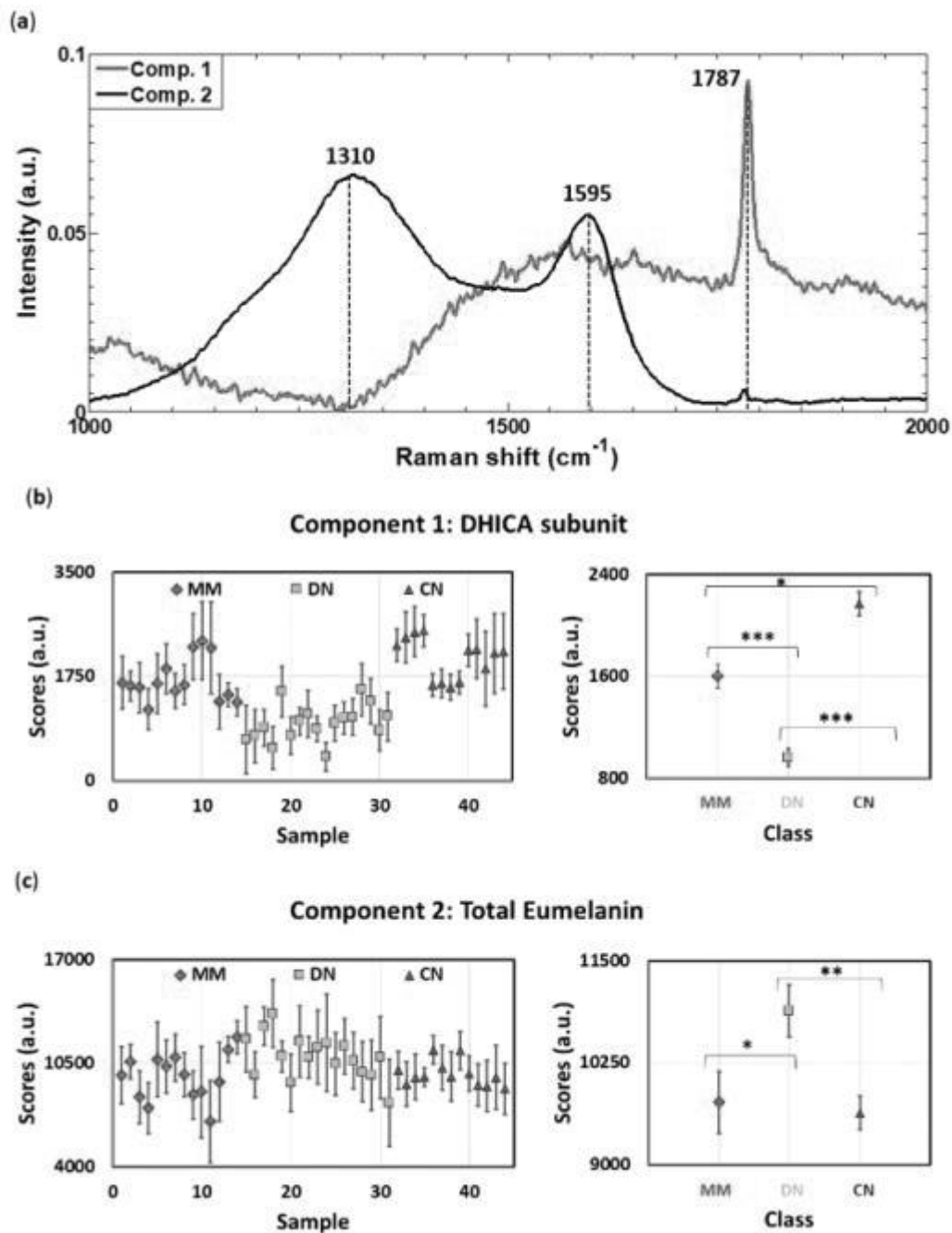
X *et al.* Objetivaram determinar a base biofísica da detecção do câncer de pele com base na espectroscopia Raman, podendo permitir que o patologista interprete os dados espectrais de maneira familiar (como espessamento da epiderme, alteração no conteúdo de colágeno e lipídio, etc.) e oriente o dermatologista na determinação do tratamento mais adequado.

No referido estudo, Feng X *et al* com base em um modelo ajustado a um conjunto de dados clínicos conseguem extrair a concentração de oito componentes ativos Raman em 100 lesões em 65 pacientes diagnosticados com melanoma maligno (MM), nevos displásicos (DN), carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e queratose actínica. Em seguida, usaram regressão logística e validação cruzada leave-one-lesion-out para determinar os componentes do modelo diagnosticamente relevante. Diante dos resultados, classificaram o colágeno e a trioleína como biomarcadores mais relevantes para representar as variações espectrais entre MM e DN, e entre câncer de pele não melanoma (NMSC) e tecido normal e, que apesar dos resultados mostrarem a melanina ser um importante marcador para classificação de lesões pigmentadas do tecido normal adjacente, descobriram não ser tão relevante quanto o colágeno e a trioleína na diferenciação do MM e DN.

Assim, Feng X *et al* concluem o estudo demonstrando que RS tem grande potencial no diagnóstico de câncer de pele de forma não invasiva ao extrair a composição biofísica da pele.

Conforme, Ruiz JJ *et al.* (2022), o melanoma maligno (MM) é a forma mais agressiva de câncer de pele, e cerca de 30% deles podem se desenvolver a partir de nevos displásicos (DN) pré-existentes e que o diagnóstico de DN é um desafio clínico relevante, pois são lesões intermediárias entre tumores benignos e malignos e, até o momento, poucos estudos têm focado seu diagnóstico. No estudo realizado, Ruiz JJ *et al.*, avalia a espectroscopia Raman (RS) juntamente com a análise multivariada (MA), para classificar 44 biópsias de tumores MM, DN e nevo composto (CN), onde implementaram uma nova metodologia para quantificar e localizar de forma não invasiva o pigmento eumelanina, considerado um biomarcador tumoral, por meio de imagens RS acopladas ao algoritmo *Multivariate Curve Resolution-Alternative Least Squares* (MCR-ALS), representando um avanço em relação à técnica atualmente estabelecida para análise de melanina, a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), que é invasiva e não pode fornecer informações sobre a distribuição espacial das moléculas. Na figura 15, exibem as pontuações de cada amostra e classe de tumor, o que reflete a abundância de cada componente molecular e permite comparações relativas de suas concentrações.

Figura 14 – a) Resultados de resolução de curva multivariada (MCR). b) Quantificação de ácido carboxílico (DHICA), c) Quantificação de eumelanina de em amostras de tumor de pele.



Fonte: Ruiz JJ *et al*, 2022.

Dessa forma, Ruiz JJ *et al*, mostraram pela primeira vez, que a razão 5,6-dihidroxiindol (DHI) para ácido 5,6-dihidroxiindol-2- carboxílico (DHICA) é maior em DN do que em lesões

MM e CN, em que essas diferenças na composição química são utilizadas pelo algoritmo Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) para identificar lesões de DN de forma eficiente, não invasiva, rápida, objetiva e de baixo custo, com sensibilidade e especificidade de 94,1% e 100%, respectivamente.

3.1.12 Câncer de Fígado

Segundo o INCA (2020), o câncer de fígado pode ser de dois tipos: primário (que começa no próprio órgão) e secundário ou metastático (tem origem em outro órgão e, com a evolução da doença, atinge também o fígado). O tipo secundário é mais frequentemente decorrente de um tumor maligno no intestino grosso ou no reto e que dentre os tumores iniciados no fígado, o mais comum é o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular, que é bastante agressivo, ocorrendo em mais de 80% dos casos.

Ainda, segundo o INCA, existem também o colangiocarcinoma (originado nos dutos biliares do fígado), o angiossarcoma (câncer raro que se origina nos vasos sanguíneos do fígado) e o hepatoblastoma, tumor maligno raro que atinge recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida.

Kun Zhang *et al.* (2018) , relata que métodos tradicionais de detecção podem ser usados para fazer o diagnóstico precoce de pacientes com câncer de fígado, porém, esses métodos são limitados por alguns fatores e não podem expor a carcinogênese tecidual em nível molecular.

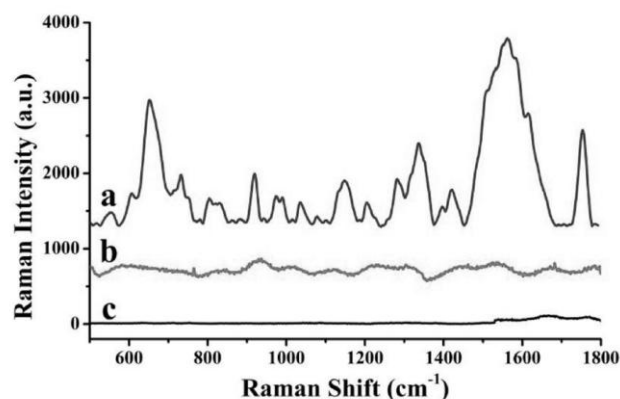
Em estudo realizado, através da técnica SERS, utilizaram 102 amostras de tecidos de 56 paciente com faixa etária de 30 a 65 anos, sendo 46 amostras de tecidos hepáticos normais e 56 amostras de tecidos hepáticos com carcinoma hepatocelular (HCC). E, que todas as amostras foram diagnosticadas por dois patologistas profissionais.

Kun Zhang *et al.*, obtiveram informações sobre as alterações da composição biológica nos tecidos hepáticos, onde os dados espectrais complexos foram processados para verificar a capacidade de resolução de SERS para tecidos cancerosos e normais do fígado com a combinação de análise de componentes principais (PCA) e análise discriminada linear (LDA).

Para a realização do estudo, utilizaram-se de Nanopartículas de Prata (Ag-NPs) no corte do tecido para aumentar de forma significativa, o sinal Raman e, cuja influência da Ag-NPs é ilustrada na figura 16.

Figura 15 - (a) Espectro SERS da fatia de tecido coberta com Ag-NPs de um paciente com câncer de fígado, (b)

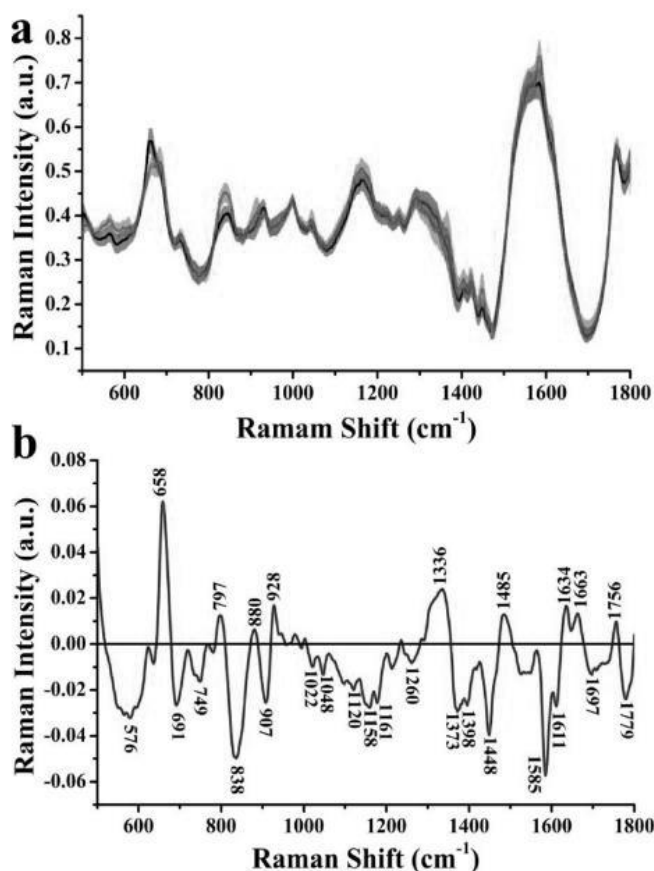
Espectro Raman da mesma fatia de tecido sem Ag-NPs. (c) O sinal de espalhamento Raman de Ag-NPs



Fonte: Kun Zhang *et al.*, 2018.

Depois de usar um ajuste multipolinomial modificado para subtrair o fundo de fluorescência dos espectros SERS na faixa de $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, a normalização (pico normalizado) dos dados SERS foi realizada, onde obtiveram que, comparado com os tecidos normais, o pico característico do sinal de espalhamento Raman para tecidos malignos do fígado é reduzido em $576, 691, 749, 838, 907, 1022, 1048, 1120, 1158, 1161, 1260, 1373, 1398, 1448, 1585, 1611, 1697$ e 1779 cm^{-1} , enquanto que aumenta em torno de $658, 797, 880, 928, 1336, 1485, 1634, 1663$ e 1756 cm^{-1} , sendo que as principais diferenças entre os espectros SERS dos tecidos hepáticos normais e cancerosos foram mostradas na posição de pico de $576, 658, 838, 907, 928, 1158, 1336, 1448, 1485, 1585, 1634$ e 1663 cm^{-1} , conforme pode ser observado na figura 17.

Figura 16 – (a) Comparação do espectro SERS médio para as fatias de tecido de câncer de fígado (linha preta, $n = 56$) versus as normais (linha vermelha, $n = 46$). A parte sombreada é o desvio padrão. (b) O espectro de diferença dos espectros SERS de amostras normais e amostras com câncer.



Fonte: Kun Zhang *et al*, 2018.

Assim, Kun Zhang *et al*, conclui que o sinal de espalhamento Raman em fatias de tecido hepático foi significativamente aumentado pela aplicação de Ag-NPs, bem como, se comparado com o diagnóstico patológico, o SERS da região da impressão digital pode ser utilizado para distinguir claramente o câncer de fígado e os tecidos normais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer afeta milhões de indivíduos todos os anos e é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Devido à sua associação com a mortalidade, é de vital importância o diagnóstico precoce do câncer. O diagnóstico precoce oferece a melhor chance para o indivíduo aflito de buscar opções de tratamento eficazes. Embora existam muitos métodos para diagnosticar cânceres individualmente, há uma forte necessidade não atendida de diagnosticar de forma precisa, definitiva e com o mínimo de invasividade todos os cânceres por meio de um

método universal. Assim, neste trabalho apresentamos uma revisão, de um recorte atual, dos avanços da Técnica de Espectroscopia Raman no Diagnóstico de Câncer.

De inúmeras maneiras diferentes, a Técnica de Espalhamento Raman como análise quimiométrica provou ser eficaz para o diagnóstico precoce de câncer. Assim, inúmeros trabalhos científicos foram publicados nos últimos anos, em revistas internacionais indexadas, sobre como a Técnica ER pode ser potencialmente utilizada para indentificar tipos específicos de Câncer. Independentemente da amostra estudada ou de qual variação da técnica é utilizada, se uma sonda é usada para coletar dados ou uma segunda técnica analítica é usada para fornecer informações complementares, a capacidade do ER em diagnosticar câncer se mostra satisfatória e não pode ser negada. A abundância de informações obtidas por meio de dados espectrais Raman fornecem não apenas informações úteis de materiais para fins de classificação, mas também fornecem informações sobre a composição bioquímica das amostras, revelando tanto informações úteis quanto potenciais biomarcadores de diferentes tipos de câncer.

A infinidade de estudos aqui relatados tem mostrado repetidamente evidências de que o ER é sensível, específica e, em geral, uma técnica confiável para diferenciar amostras saudáveis de doente. O estudo aponta que as combinações das técnicas ER com outras metodologias puderam auxiliar no desenvolvimento e aprimoramento do diagnóstico dos diversos tipos de Câncer. Os resultados demonstram ser bem-sucedidos, se tornando um método universal singular para o diagnóstico de câncer.

REFERÊNCIAS

A. Falamas, C.I. Faur, S. Ciupe, M. Chirila, H. Rotaru, M. Hedesiu, S. Cinta Pinzaru, Rapid and noninvasive diagnosis of oral and oropharyngeal cancer based on micro-Raman and FT-IR spectra of saliva, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 252, 2021, 119477, ISSN 1386-1425, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119477>.

Barelli, Alexandre Antonio *et al.* Análise do efeito da fluorescência produzida em amostra de gasolina com observação dos espectros Raman utilizando LPA2v e PCA. *Brazilian Applied Science Review*, v. 4, n. 6, p. 3976-3982, 2020.

Barros, A. J. S. & Lehfeld, N. A. S. (2007). *Fundamentos de Metodologia Científica* (3ª ed.). Prentice-Hall.

Bocato, V. R. C. Metodologia da pesquisa bibliográfica na área odontológica e o artigo científico como forma de comunicação. *Revista Odontol. Univ. Cidade São Paulo, São Paulo*, v. 18, n. 3, p. 265-274, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2019 [acesso em 24 ago. 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

Bratchenko IA, Bratchenko LA, Moryatov AA, Khristoforova YA, Artemyev DN, Myakinin OO, Orlov AE, Kozlov SV, Zakharov VP. In vivo diagnosis of skin cancer with a portable Raman spectroscopic device. *Exp Dermatol.* 2021 May;30(5):652-663. doi: 10.1111/exd.14301. Epub 2021 Feb 21. PMID: 33566431.

Dai, J., He, X., Li, Z. *et al.* Fiber-Optic Raman Spectrum Sensor for Fast Diagnosis of Esophageal Cancer. *Photonic Sens* 9, 53–59 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13320-018-0516-7>

Esmonde-White, Karen A. *et al.* Raman spectroscopy of bone metastasis. In: *Photonic Therapeutics and Diagnostics VIII*. SPIE, 2012. p. 876-881.

Fallahzadeh O, Dehghani-Bidgoli Z, Assarian M. Raman spectral feature selection using ant colony optimization for breast cancer diagnosis. *Lasers Med Sci.* 2018 Nov;33(8):1799-1806. doi: 10.1007/s10103-018-2544-3. Epub 2018 Jun 4. PMID: 29862464.

Feng X, Moy AJ, Nguyen HTM, Zhang Y, Zhang J, Fox MC, Sebastian KR, Reichenberg JS, Markey MK, Tunnell JW. Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis. *J Biomed Opt.* 2018 May;23(5):1-10. doi: 10.1117/1.JBO.23.5.057002. PMID: 29752800.

Giamougiannis P, Silva RVO, Freitas DLD, Lima KMG, Anagnostopoulos A,

Angelopoulos G, Naik R, Wood NJ, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Raman spectroscopy of blood and urine liquid biopsies for ovarian cancer diagnosis: identification of chemotherapy effects. *J Biophotonics*. 2021 Nov;14(11):e202100195. doi: 10.1002/jbio.202100195. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34296515.

Gil, Antônio Carlos. Métodos e técnicas de pesquisa social. 5. Ed. São Paulo: Atlas, 2007.

Godoy, A. S. (1995). Introdução à pesquisa qualitativa e suas possibilidades. *Revista de Administração de Empresas*, 35(2), 57-63.

Guerrini L, Alvarez-Puebla RA. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Cancer Diagnosis, Prognosis and Monitoring. *Cancers (Basel)*. 2019 May 29;11(6):748. doi: 10.3390/cancers11060748. PMID: 31146464; PMCID: PMC6627759.

Hollon TC, Lewis S, Pandian B, Niknafs YS, Garrard MR, Garton H, Maher CO, McFadden K, Snuderl M, Lieberman AP, Muraszko K, Camelo-Piragua S, Orringer DA. Rapid Intraoperative Diagnosis of Pediatric Brain Tumors Using Stimulated Raman Histology. *Cancer Res*. 2018 Jan 1;78(1):278-289. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1974. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29093006; PMCID: PMC5844703.

Hong Y, Li Y, Huang L, *et al*. Label-free diagnosis for colorectal cancer through coffee ring-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy on blood serum. *J. Biophotonics*. 2020;13:e201960176. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960176>

Ibrahim, O.; Toner, M.; Flint, S.; Byrne, H.J.; Lyng, F.M. The Potential of Raman Spectroscopy in the Diagnosis of Dysplastic and Malignant Oral Lesions. *Cancers* 2021, 13, 619. <https://doi.org/10.3390/cancers13040619>

Instituto Nacional do Câncer (INCA) [homepage on the Internet]. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Available from: URL: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf. Acessado em Fevereiro, 2021

Jin H, Lin T, Han P, Yao Y, Zheng D, Hao J, Hu Y, Zeng R. Efficacy of Raman spectroscopy in the diagnosis of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(47):e18066. doi: 10.1097/MD.00000000000018066. PMID: 31764837; PMCID: PMC6882629.

Júnior, José Geraldo de Alencar Santos *et al*. Câncer de mama: relato de caso e critérios de diagnóstico. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 1, p. 101-103, 2018.
Kim DK, Kim YH, Lee HY, Lee S, Doo SW, Yang WJ, Song YS, Kim KH, Kim JH.

Diagnostic accuracy of Raman spectroscopy for the diagnosis of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2021 Apr-Jun;17(2):426-433. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_891_19. PMID: 34121688.

Kun Zhang, Chunyan Hao, Baoyuan Man, Chao Zhang, Cheng Yang, Mei Liu, Qianqian Peng, Chuansong Chen, Diagnosis of liver cancer based on tissue slice surface enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis, *Vibrational Spectroscopy*, Volume 98, 2018, Pages 82-87, ISSN 0924-2031, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.07.010>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203118301942>)

Lakatos, Eva Maria; MARCONI, Marina de Andrade. *Fundamentos de metodologia científica*. 5 ed. São Paulo: Atlas, 2004.

Lei J, Yang D, Li R, Dai Z, Zhang C, Yu Z, Wu S, Pang L, Liang S, Zhang Y. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for diagnosis and analysis of serum samples with different types lung cancer. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021 Nov 15;261:120021. doi: 10.1016/j.saa.2021.120021. Epub 2021 May 26. PMID: 34116414.

Lima, A. M. F.; et al. Discrimination of non-melanoma skin cancer and keratosis from normal skin tissue in vivo and ex vivo by Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. Volume 100, pages 131 – 141. January, 2019.

Lin Y, Gao J, Tang S, Zhao X, Zheng M, Gong W, Xie S, Gao S, Yu Y, Lin J. Label-free diagnosis of breast cancer based on serum protein purification assisted surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021 Dec 15;263:120234. doi: 10.1016/j.saa.2021.120234. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34343842.

Lyng FM, Traynor D, Ramos IR, Bonnier F, Byrne HJ. Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Nov;407(27):8279-89. doi: 10.1007/s00216-015-8946-1. Epub 2015 Aug 16. PMID: 26277185.

Ma H, Sun X, Chen L, Cheng W, Han XX, Zhao B, He C. Multiplex Immuno-chips for High-Accuracy Detection of AFP-L3% Based on Surface-Enhanced Raman Scattering: Implications for Early Liver Cancer Diagnosis. *Anal Chem.* 2017 Sep 5;89(17):8877-8883. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01349. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28770990.

Maryam Bahreini, Ahmad Hosseinzadegan, Arian Rashidi, Seyed Rouhollah Miri, Hamid Reza Mirzaei, Parastoo Hajian, A Raman-based serum constituents' analysis for gastric

cancer diagnosis: In vitro study, *Talanta*, Volume 204, 2019, Pages 826-832, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.068>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019306939>)

Medici, André Cezar. Custos do tratamento do câncer no Brasil: Como melhorar o foco. *Blog Monitor de Saude*, Ano, v. 12, 2018.

Melo, Genecy Calado de. Análise salivar através de Espectroscopia Raman para o diagnóstico do cancro de boca: uma revisão sistemática. 2018. Tese de Doutorado.

Mitsutake, H.; Poppi, R.; Breitzkreitz, M. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 11, p. 2243–2258, 2019.

Noothalapati H, Iwasaki K, Yamamoto T. Non-invasive diagnosis of colorectal cancer by Raman spectroscopy: Recent developments in liquid biopsy and endoscopy approaches. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021 Sep 5;258:119818. doi: 10.1016/j.saa.2021.119818. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33957445.

O'Dea D, Bongiovanni M, Sykietis GP, Ziros PG, Meade AD, Lyng FM, Malkin A. Raman spectroscopy for the preoperative diagnosis of thyroid cancer and its subtypes: An in vitro proof-of-concept study. *Cytopathology.* 2019 Jan;30(1):51-60. doi: 10.1111/cyt.12636. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30276947.

Pacheco, Laís Henrique *et al.* Desenvolvimento de um sistema contendo nanopartículas de ouro dispersas em material graxo e sua aplicação em espectroscopia raman intensificada por superfícies (SERS) para avaliação de moléculas orgânicas sulfuradas. 2017.

Park J, Hwang M, Choi B, Jeong H, Jung JH, Kim HK, Hong S, Park JH, Choi Y. Exosome Classification by Pattern Analysis of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Data for Lung Cancer Diagnosis. *Anal Chem.* 2017 Jun 20;89(12):6695-6701. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00911. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28541032.

Ruiz JJ, Marro M, Galván I, Bernabeu-Wittel J, Conejo-Mir J, Zulueta-Dorado T, Guisado-Gil AB, Loza-Álvarez P. Novel Non-Invasive Quantification and Imaging of Eumelanin and DHICA Subunit in Skin Lesions by Raman Spectroscopy and MCR Algorithm: Improving Dysplastic Nevi Diagnosis. *Cancers (Basel).* 2022 Feb 18;14(4):1056. doi: 10.3390/cancers14041056. PMID: 35205803; PMCID: PMC8870175.

Santos, Adriele R. *et al.* Aplicação da espectroscopia Raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. *Química Nova*, v. 42, n. 5, p. 489-496, 2019.

Sbroscia M, Di Gioacchino M, Ascenzi P, Crucitti P, di Masi A, Giovannoni I, Longo

F, Mariotti D, Naciu AM, Palermo A, Taffon C, Verri M, Sodo A, Crescenzi A, Ricci MA. Thyroid cancer diagnosis by Raman spectroscopy. *Sci Rep.* 2020 Aug 7;10(1):13342. doi: 10.1038/s41598-020-70165-0. PMID: 32770073; PMCID: PMC7414870.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21332.

Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, (2021).

Wang J, Liang D, Feng J, Tang X. Multicolor Cocktail for Breast Cancer Multiplex Phenotype Targeting and Diagnosis Using Bioorthogonal Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobes. *Anal Chem.* 2019 Sep 3;91(17):11045-11054. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01382. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31361124.

X. Bi, J. Nyman, C. Morrissey, M. P. Roudier, A. Dowell, and A. Mahadevan-Jansen, "Using Raman Spectroscopy to Characterize Bone Metastasis and to Evaluate Treatment Response in Prostate Cancer Patients," in *Biomedical Optics and 3-D Imaging*, OSA Technical Digest (Optica Publishing Group, 2012), paper BW1B.7..

Zanella, Liane Carly Hermes. Metodologia de estudos e de pesquisa em administração. Florianópolis: Capes, 2009.

Zhan Q, Li Y, Yuan Y, Liu J, Li Y. The accuracy of Raman spectroscopy in the detection and diagnosis of oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Raman Spectrosc.* 2020;1–21. <https://doi.org/10.1002/jrs.5940>

Zhang K, Hao C, Huo Y, Man B, Zhang C, Yang C, Liu M, Chen C. Label-free diagnosis of lung cancer with tissue-slice surface-enhanced Raman spectroscopy and statistical analysis. *Lasers Med Sci.* 2019 Dec;34(9):1849-1855. doi: 10.1007/s10103-019-02781-w. Epub 2019 Apr 13. PMID: 30989458.

Zheng Q, Kang W, Chen C, Shi X, Yang Y, Yu C. Diagnosis accuracy of Raman spectroscopy in colorectal cancer: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019 Aug;98(34):e16940. doi: 10.1097/MD.00000000000016940. PMID: 31441886; PMCID: PMC6716686.

Zhu WF, Cheng LX, Li M, Zuo D, Zhang N, Zhuang HJ, Xie D, Zeng QD, Hutchison JA, Zhao YL. Frequency Shift Raman-Based Sensing of Serum MicroRNAs for Early Diagnosis

and Discrimination of Primary Liver Cancers. *Anal Chem.* 2018 Sep 4;90(17):10144-10151. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01798. Epub 2018 Jul 18. PMID: 29974736.