

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

**DIAGNÓSTICO DA COVID-19 POR ESPECTROSCOPIA RAMAN:
ESTUDO DE VALIDAÇÃO COM RT-PCR E IMUNOCROMATOGRAFIA**

TESE DE DOUTORADO

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

São José dos Campos, 16 de maio de 2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

**DIAGNÓSTICO DA COVID-19 POR ESPECTROSCOPIA RAMAN:
ESTUDO DE VALIDAÇÃO COM RT-PCR E IMUNOCROMATOGRAFIA**

TESE DE DOUTORADO

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

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

São José dos Campos, 16 de maio de 2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

DIAGNÓSTICO DA COVID-19 POR ESPECTROSCOPIA RAMAN: ESTUDO DE VALIDAÇÃO COM RT-PCR E IMUNOCROMATOGRAFIA

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

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Orientador: Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr

Co-orientador: Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Adriana Barrinha F. Moretti (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Livia Helena Moreira da Silva Melo (suplente interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Henrique Cunha Carvalho (externo)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Pedro Luiz Brito (externo)

Grupo de Assistência à criança com câncer (GACC)

Prof. Dra. Regiane Albertini (suplente externo)

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

São José dos Campos, 16 de maio de 2025

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

ANA CRISTINA CASTRO GOULART

Possui graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade de Mogi das Cruzes (1994), Pós-graduação *latu sensu* em: Hematologia (1996), Biotecnologia e Biologia Molecular (1998) e Mestrado em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi (2021). Atualmente é gestora do setor de hematologia do laboratório municipal de Jacareí.

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

G727d	Goulart, Ana Cristina Castro Diagnóstico da Covid-19 por espectroscopia Raman: estudo de validação com RT-PCR e imunocromatográfica / Ana Cristina Castro Goulart – 2025. 78 f.: il. Orientador: Renato Amaro <u>Zângaro</u>. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2025. Bibliografia: f. 64-76. 1. Engenharia Biomédica. 2. Espectroscopia Raman. 3. RT-PCR. 4. Covid-19. 5. Imunocromatográfica. I. Título. CDD 577
-------	--

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que são minhas raízes
Aos meus filhos, frutos doces que ganhei na vida

.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me colocar no lugar certo, permitindo que eu aprenda e possa contribuir para os meus semelhantes.

À minha mãe Imaculada (*in memoriam*), por me incentivar a estudar e que mesmo com mãos cansadas e olhos que já não enxergavam estava sempre disposta a aliviar o peso dos meus ombros (jamais esquecerei o brigadeiro que fez para a festa da escola do Gabriel). Ao meu pai Edmundo (*in memoriam*), por sua simplicidade em encarar a vida e com seu sorriso fácil me fez entender que o amor pode ser construído, fico imensamente feliz por ter gravado nossas conversas e poder ouvi-lo agora, mesmo a essa distância.

Aos meus amados filhos Gabriel e André, por participarem da minha jornada compreendendo os meus momentos de ausência e me apoiando nos momentos difíceis. Saibam que tudo que faço envolve o bem-estar de vocês e que, cada página escrita tem impresso os abraços e beijinhos que recebia enquanto estava estudando e não posso deixar de mencionar a ajuda do Gabriel com os gráficos e edição de imagens. Agradeço imensamente a Deus, pelo tamanho amor que sinto por vocês dois e por deixarem minha vida com mais sentido.

Ao meu orientador, professor Dr. Renato Amaro Zângaro pelo apoio, confiança e tantas conversas que me fizeram ver o mundo de uma outra maneira, o senhor foi uma luz em momentos de escuridão e ao meu co-orientador Landulfo Silveira Júnior agradeço a imensa paciência, profissionalismo e dedicação no acompanhamento dos experimentos e análises em espectroscopia Raman.

À Nídia que sempre me ajudava a resolver todos os tipos de problemas com seu jeito competente, mas extremamente amoroso e ainda adoçava meus dias com sua palha italiana.

A todos os professores da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi pelos ensinamentos e dedicação durante o curso de mestrado e doutorado.

Financiadores

Landulfo Silveira Jr. agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo No. 2009/01788-5) pela aquisição do espectrômetro Raman e a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo No. 306344/2017-3) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa.

Renato Amaro Zângaro agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo No. 306344/2017-3) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa.

Ana Cristina Castro Goulart agradece ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (CAPES-PROSUP) pela Bolsa de Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.
Escolas que são gaiolas existem para os pássaros
desaprenderem o voo.”

Rubem Alves

RESUMO

Em dezembro de 2019 foram relatados os primeiros casos da COVID-19 em Wuhan, China, essa doença se alastrou rapidamente pelo mundo e matou 7 milhões de pessoas entre 2020 e 2024. Só no Brasil foram 700.000 óbitos nesse período, representando uma ameaça global à saúde pública e economia. Neste estudo, aplicamos a espectroscopia Raman para o diagnóstico da COVID-19 e a comparamos com duas técnicas analíticas convencionais. Foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 50 indivíduos positivos e 64 indivíduos negativos para COVID-19, sendo 94 analisadas por imunocromatografia e 20 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo (830 nm, 350 mW) em triplicata, sendo submetidos à análise exploratória com análise do componente principal (PCA) para identificação das diferenças espectrais e análise discriminante por PCA (PCA-DA) e por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para classificação dos espectros de soro sanguíneo em amostras negativas (Controle) e positivas para COVID-19. Os espectros de ambos os grupos mostraram picos referentes à constituição basal do soro (principalmente albumina). Os espectros de diferença mostraram diminuição nos picos referentes a proteínas e aminoácidos para o grupo positivo. As variáveis da PCA apresentaram diferenças espectrais mais detalhadas relacionadas às alterações bioquímicas decorrentes da COVID-19, como aumento de lipídios incluindo fosfolipídios, compostos nitrogenados aminas/amidas e ácidos nucleicos, e diminuição de proteínas e aminoácidos no grupo COVID-19. Ademais, alguns elementos foram detectados em amostras provenientes da técnica de imunocromatografia como os carotenoides, enquanto os compostos sulfurados apenas nas amostras do RT-PCR. A análise discriminante com validação cruzada *leave-one-out* (deixe um de fora) aplicada aos componentes principais classificou os espectros com sensibilidade de 87% e especificidade de 100% para o grupo RT-PCR, enquanto para o grupo de imunocromatografia foi observada sensibilidade de 84% e especificidade de 95%. No modelo de classificação o conjunto de espectros obteve sensibilidade de 84%, especificidade de 93,8% demonstrando resultados eficazes e viabilizando novos estudos como identificador para amostras desconhecidas. A espectroscopia Raman tem se mostrado eficaz para o diagnóstico de infecção por COVID-19.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; RT-PCR; COVID-19; imunocromatografia; mínimos quadrados parciais; análise de componente principal.

ABSTRACT:

COVID-19 DIAGNOSIS BY RAMAN SPECTROSCOPY: VALIDATION STUDY WITH RT-PCR AND IMMUNOCHROMATOGRAPHY

In December 2019, the first cases of COVID-19 were reported in Wuhan, China. This disease spread rapidly around the world and killed 7 million people between 2020 and 2024. In Brazil alone, there were 700,000 deaths during this period, representing a global threat to public health and the economy. In this study, we used Raman spectroscopy to diagnose COVID-19 and compared it with two conventional analytical techniques. Blood serum samples from 50 COVID-19 positive and 64 COVID-19 negative individuals were analyzed, 94 by immunochromatography and 20 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Raman spectra were obtained on a dispersive Raman spectrometer (830 nm, 350 mW) in triplicate, and subjected to exploratory analysis with principal component analysis (PCA) to identify spectral differences and discriminant analysis by PCA (PCA-DA) and partial least squares (PLS-DA) to classify blood serum spectra into COVID-19 negative (Control) and positive samples. The spectra of both groups showed peaks referring to the basal constitution of the serum (mainly albumin). The difference spectra showed a decrease in the peaks referring to proteins and amino acids for the positive group. The PCA variables showed more detailed spectral differences related to the biochemical changes resulting from COVID-19, such as an increase in lipids including phospholipids, amine/amide nitrogen compounds and nucleic acids, and a decrease in proteins and amino acids in the COVID-19 group. In addition, some elements were detected in samples from the immunochromatography technique, such as carotenoids, while sulphur compounds were only detected in RT-PCR samples. The discriminant analysis with leave-one-out cross-validation applied to the principal components classified the spectra with a sensitivity of 87% and specificity of 100% for the RT-PCR group, while for the immunochromatography group, a sensitivity of 84% and specificity of 95% were observed. In the classification model, the set of spectra had a sensitivity of 84% and specificity of 93.8%, demonstrating effective results and enabling further studies as an identifier for unknown samples. Raman spectroscopy has proven effective for diagnosing COVID-19 infection.

Keywords: Raman spectroscopy; RT-PCR; COVID-19; Immunochromatography; partial least squares; principal component analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivo geral	22
1.2 Objetivos específicos	22
1.3 Hipótese	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Doença por coronavírus 19 (COVID-19)	24
2.1.1 Agente etiológico	25
2.1.2 Mecanismo de ação do vírus e patogênese	25
2.1.3 Transmissão e manifestações clínicas	26
2.1.4 Diagnóstico	30
2.1.5 Prevenção e tratamento	32
2.2 Espectroscopia Raman	33
2.2.1 A espectroscopia Raman na análise de materiais biológicos	35
2.2.2 Aplicações da espectroscopia Raman às doenças virais	36
2.3 Ferramentas estatísticas para análises espectrais	37
2.3.1 Análise de componente principal (PCA)	37
2.3.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS – <i>partial least squares</i>) e PCA	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Apreciação ética	39
3.2 Amostras de soro	40
3.2.1 Amostras de soro usando a tecnologia RT-PCR	40
3.2.2 Amostras de soro usando a tecnologia de imunocromatografia	40
3.2.3 Coleta e preparo das amostras de soro	40

3.3 Aquisição dos espectros e pré-processamento	41
3.4Análise de componente principal (PCA) e mínimos quadrados parciais (PLS) para extração de características (análise exploratória) e discriminação	43
3.4.1 Espectroscopia Raman comparada ao RT-PCR – ferramentas estatísticas	44
3.4.2 Espectroscopia Raman comparada ao teste de imunocromatografia – ferramentas estatísticas	44
3.4.3 Associação dos dados para elaboração de um modelo devalidação utilizando todas as amostras das técnicas RT-PCR e imunocromatografia	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Análise exploratória por PCA com análise discriminante e classificação	49
4.2 Análise discriminante e classificação RT-PCR e Imunocromatografia	51
4.2.1Análise discriminante e classificação de todos os conjuntos de dados	51
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE A: Parecer Consubstanciado – CAAE	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do coronavírus	25
Figura 2: Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 na célula	26
Figura 3: Representação esquemática da patogênese pelo SARS-CoV-2	27
Figura 4: Mortes por COVID-19 no mundo e no Brasil	28
Figura 5: Gráfico de óbitos no Brasil entre 2020 e 2024	29
Figura 6: Princípio da técnica de RT-PCR para COVID-19 e gráfico com resultado	30
Figura 7: Relação entre esquema vacinal doses da vacina e queda da média móvel de óbitos no Brasil entre abril a agosto de 2021	32
Figura 8: Esquema de transição entre os níveis de energia molecular e suas bandas Raman correspondentes	34
Figura 9: Fluxograma dos experimentos	39
Figura 10: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P1) e foto do equipamento	42
Figura 11: Exemplo de espectro Raman de soro sanguíneo após a remoção da fluorescência de fundo por polinômio de ordem 7 aplicado em toda a faixa	43
Figura 12: Médias dos espectros Raman obtidas a partir de amostras de soro sanguíneo de pacientes negativos (grupo controle) e positivos (COVID-19), diagnosticados por imunocromatografia e separados por tipo de imunoglobulina (IgM+, IgM/IgG+ e IgG+).	46
Figura 13: Médias dos espectros Raman obtidas a partir de amostras do soro sanguíneo de pacientes positivos para COVID-19 diagnosticados por RT-PCR, bem como os espectros de diferença (COVID-19 e controle).	45

Figura 14: Gráfico dos primeiros seis componentes principais, escore e Loadings (PCs) para as amostras provenientes de imunocromatografia	49
Figura 15: Gráfico dos primeiros seis componentes principais, escores e atribuições bioquímica para as amostras provenientes do experimento RT-PCR	50
Figura 16: Espectros obtidos pela média de todos os indivíduos grupo negativos e grupo positivo para COVID-19, obtidos dos experimentos RT-PCR e imunocromatografia	52
Figura 17: Espectros médios e PCs provenientes da união de todos os espectros obtidos nos experimentos RT-PCR e Imunocromatografia	53
Figura 18: Comparativo entre o componente principal do experimento RT-PCR e imunocromatografia e do conjunto de dados	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos e mortes por COVID-19 no Brasil por região	29
Tabela 2: Número de amostras de soro para espectroscopia Raman	41
Tabela 3: Agrupamento bioquímico por posições dos picos das bandas do espectro Raman – atribuições segundo a literatura para estudos de COVID-19	46
Tabela 4: Métrica de desempenho da espectroscopia Raman	51
Tabela 5: Matriz de contingência	55
Tabela 6: Matriz de contingência – sensibilidade, especificidade e acurácia	55
Tabela 7: Sensibilidade, especificidade e acurácia da média do conjunto de dados – controle e COVID-19 provenientes dos experimentos RT-PCR e imunocromatografia	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	do inglês: ácido desoxirribonucleico
RNA	do inglês: ácido ribonucleico
PC	componente principal
SARS-CoV-2	do inglês: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
ELISA	do inglês: ensaio de Imunoabsorção Enzimática
COVID-19	do inglês: doença por Coronavírus 19
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
ACE2	do inglês: enzima conversora da angiotensina 2
ER	espectroscopia Raman
PHE	do inglês: fenilalanina
Gp	Glicoproteína
HR1	do inglês: repetição heptada (<i>HeptadRepeat 1</i>)
HR2	do inglês: repetição heptada – (<i>HeptadRepeat 2</i>)
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
LDA	do inglês: análise discriminante linear (<i>linear discriminant analysis</i>)
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLS	do inglês: mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares</i>)
PLS-DA	do inglês: mínimos quadrados parciais – análise discriminante (<i>partial least squares – discriminant analysis</i>)
PCA	do inglês: Análise do componente principal (<i>principal component analysis</i>)
PCA-DA	do inglês: Análise do componente principal – análise discriminante (<i>principal component analysis – discriminant analysis</i>)
SERS	do inglês: espectroscopia Raman aprimorada de superfície (<i>surface enhanced Raman spectroscopy</i>)
TARV	terapia antirretroviral combinada
Tyr	do inglês: Tirosina
RT-PCR	do inglês: transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase
Trp	do inglês: Triptofano

1 INTRODUÇÃO

A palavra vírus tem origem no Latim e significa veneno ou toxina. Não existe um consenso em como surgiram os primeiros vírus, porém o convívio entre os seres humanos e esses agentes patológicos é muito antigo. No Egito foram observados hieróglifos nos quais aparecem indivíduos com características semelhantes à poliomielite, algumas múmias egípcias apresentavam erupções atribuídas à varíola, porém, apenas em 1932 foi identificado o primeiro vírus. Os vírus não possuem aparatos enzimáticos para replicação e dependem do material genético de uma célula hospedeira para sua perpetuação, além disso possuem baixa capacidade estrutural composta de: material genético, capsídeo e alguns contam com envelope, porém são altamente capazes ao utilizar a maquinaria da célula hospedeira para redirecionar o metabolismo celular em prol das suas necessidades (Fiocruz, 2009). Esses agentes patológicos fazem parte da evolução e seleção natural e sempre estiveram presentes entre outros organismos, atacando e sendo atacado pelo sistema imunológico, fazendo recombinações entre os agentes virais, bem como virais e hospedeiros e nesse caso, podem expressar os genes do hospedeiro propagando-se no organismo infectado (Sinkovics; Horvath; Horak, 1998).

Conforme a população foi crescendo e surgindo novas demandas, os seres humanos foram modificando seu ambiente natural e, ao mesmo tempo, houve uma necessidade de interação e domesticação de animais para ajuda nos trabalhos. Dessa união iniciou-se a propagação das doenças relacionadas às infecções virais (Silva *et al.*, 2023).

No início da década de 80, nos Estados Unidos, foram observados casos de pneumonia causadas pela bactéria *Pneumocystis carinii* em cinco homossexuais jovens do sexo masculino. Três pacientes apresentavam resposta celular proliferativa *in vitro* profundamente deprimidas, enquanto os outros dois, não foram testados. Em nota realizada em 1981, o médico considerou a possibilidade de uma disfunção celular-imune relacionada a uma exposição comum, que predispunha os indivíduos a infecções oportunistas como pneumocistose, candidíase e mononucleose sugerindo que a *P. carinii* deveria ser considerada como diagnóstico diferencial em pacientes homossexuais com dispneia e pneumonia. Esses foram os primeiros relatos associados a portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Gottlieb, 2006).

As regiões da África central e oriental apresentaram a maior frequência de casos e por isso, atribuiu-se a essa região o surgimento da infecção (Forattini, 1993).

Muitas pessoas morreram na década de 80 até a descoberta de medicamentos antirretrovirais que controlam o avanço da viremia. A partir de 1991, o Brasil começou a distribuir gratuitamente estes medicamentos para os portadores do vírus, porém ainda não foi encontrada a cura para a essa doença e no período entre 2019 e 2023 a Aids foi a causa de 157.308 óbitos no país (Fiocruz, 1999; Ministério da saúde, 2023).

Em dezembro de 2019, uma outra doença viral se transformou em uma pandemia rapidamente, levando à alta mortalidade e grande impacto econômico. Assim como no HIV, foram observados casos de pneumonia, porém causadas por uma nova cepa de coronavírus que se propagava pela cidade de Wuhan, na China. Em janeiro de 2020, a doença espalhou-se para outros países e foi considerada como Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e em março de 2020 foi classificada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020).

A doença por coronavírus 2019 (COVID-19) é causada pelo vírus denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) e sua transmissão se dá por meio de contato direto entre indivíduos contaminados e por superfícies contendo o vírus, portanto as orientações da OMS e governos para contenção da doença foi solicitar o distanciamento social que levou a uma diminuição da força de trabalho, impactando grandemente a economia global (Shrestha *et al.*, 2020; Nicola *et al.* 2020). A evolução da doença depende do sistema imunológico do indivíduo, havendo casos assintomáticos até pneumonia de graus variáveis de gravidade (Khristoforova; Bratchenko, 2023).

A detecção das doenças virais é de suma importância para o controle da propagação do agente etiológico. Em meio a pandemia que já assolava diversos países, os testes laboratoriais para a COVID-19 foram desenvolvidos e implementados. Em abril de 2020 o Brasil recebeu o primeiro lote do teste padrão ouro RT-PCR (transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase), que detecta o RNA viral. No entanto, houve um impacto importante no sistema de saúde, pois para essa técnica era necessário equipamentos adequados e pessoal treinado para a extração e manipulação do material genético, além disso o tempo para a liberação dos resultados tornou-se inviável especialmente no Brasil onde os testes ficaram centralizados nos laboratórios do

governo(Vasconcelos, 2020). Outros métodos surgiram como: ELISA e Imunocromatografia, detectando a presença de anticorpos IgA, IgM e IgG separando a fase aguda (IgA e IGM) da fase convalescente (IgG), porém esses testes possuem menor sensibilidade e especificidade que o teste RT-PCR (Auwaerter 2020; Duong, Wright, Justman, 2020; Xavier *et al.*, 2020).

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica óptica que permite a medição da energia vibracional a partir da interação entre a luz e a matéria. Essa interação induz a distorção da nuvem eletrônica com consequente alteração nos estados virtuais. No espalhamento inelástico chamado de Raman, uma parte da luz espalhada apresenta comprimento de onda diferente da luz incidente, resultando em fótons de maior ou menor energia, enquanto no espalhamento Rayleigh o comprimento da onda da luz espalhada é o mesmo que o da luz incidente (Smith, Dent, 2004;Hanlonet *al.*,2000;Orlando *et al.*,2021).

Por proporcionar informações a nível molecular, essa técnica tem sido utilizada e aprimorada para uma grande variedade de estudos patológicos, desde infecções virais, bacterianas até cânceres (Melitto *et al.*, 2022; Goulart *et al.*, 2022;Luet *al.*,2023). Estadistinação entre diversas doenças se dá pela capacidade da ER caracterizar biomoléculas como as proteínas, DNA, lipídios e carboidratos, que são constituintes dos sistemas biológicos de alta complexidade como tecidos e sangue com seus constituintes: células, soro e plasma (Butler *et al.*, 2016; Kuharet *al.*, 2018).

Pesquisas têm sido realizadas com sucesso, na detecção de doenças virais utilizando diferentes materiais biológicos. O vírus da hepatite B e C foram detectados no soro utilizando as técnicas de ER com elevada sensibilidade e especificidade (Orlando *et al.*,2021).

Durante a pandemia de COVID-19, muitos estudos foram realizados acerca do vírus SARS-CoV-2, entre eles a ER apresentou resultados relevantes com sensibilidade de 87% e especificidade de 100% além de apresentar um diagnóstico rápido da patologia. Outro estudo concluiu que a ER pode ser uma ferramenta eficaz e conveniente para a triagem da COVID-19 (Goulart *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2021).

Em comparação às técnicas convencionais que apresentam várias etapas nas metodologias, uso de reagentes e demora na liberação dos resultados, a espectroscopia Raman surge como alternativa na identificação das doenças virais. Esse estudo visa

aplicar essa metodologia comparando-a com diferentes métodos laboratoriais como Reação de transcriptase combinada com reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e Imunocromatografia e por fim, analisar o conjunto de todas as amostras, com a finalidade de criar um modelo de validação cruzada “deixe uma de fora” (*leave-one-out cross-validation*). As amostras selecionadas foram Negativas e Positivas para COVID-19 e a espectroscopia Raman foi utilizada no intuito de reconhecer diferenças estatisticamente robustas e utilizar os componentes principais na classificação e diferenciação entre normal e patológico.

1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de espectroscopia Raman na definição de um padrão espectral de amostras de soro de indivíduos negativos e positivos para COVID-19, visando o diagnóstico, e a elaboração de um modelo estatístico para classificação da presença ou ausência da doença.

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Aplicar a espectroscopia Raman em amostras de soro visando obter diferenças espectrais entre saudáveis (negativos para COVID-19) e doentes (positivos para COVID-19) comparando os resultados com metodologias do tipo RT-PCR e Imunocromatografia;
- Aplicar o teste t de Student na média dos espectros Raman obtidos a partir de amostras de soro de indivíduos saudáveis e doentes a fim de identificar picos com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$);
- Identificar os principais picos espectrais obtidos das amostras médias de cada um dos grupos, associando a composição química do soro de cada um deles.

- Classificar os espectros das amostras provenientes de sujeitos saudáveis e doentes por análise discriminante através dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise de componente principal (PCA-DA).
- Elaborar um modelo baseado em estatística (*leave-One-Out-Cross-validation*) para validação dos dados classificando-o quanto a sensibilidade, especificidade e acurácia.

1.3 Hipótese

Considerando que a espectroscopia Raman tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade na detecção de ácido nucleico e diferentes metabólitos provenientes do ataque viral, ela é uma ferramenta capaz de detectar material genético do vírus e metabólitos em resposta ao ataque do vírus SARS-CoV-2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença por coronavírus 19 (COVID-19)

Os coronavírus pertencem a família *Coronaviridae* e possuem esse nome em decorrência de espículas presentes em sua superfície, formando uma estrutura semelhante a coroa quando observados em microscopia eletrônica (Ministério da Saúde, 2020).

Esses vírus surgiram há mais de 70 anos e são conhecidos por contaminar diferentes tipos de animais, ou seja, são zoonóticos e encontrados comumente em gados, morcegos e camelos. A primeira detecção do coronavírus (CoV) em uma doença respiratória, remonta a 1937 onde afetou aves de maneira devastadora. Em 1965 foi comprovado que os coronavírus eram responsáveis por aproximadamente 30% dos quadros de secreções (catarros) entre humanos. Em 2002, uma classe de coronavírus denominado SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave), infectou 8422 pessoas, causando 916 mortes no mundo. No ano de 2012, o MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio), atingiu 1401 pessoas das quais 543 morreram. Em dezembro de 2019, foi detectado na China, o primeiro caso de pneumonia causado por um novo coronavírus, inicialmente designado de 2019-nCoV (novo coronavírus), que em fevereiro de 2020 foi nomeado de SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) causador da COVID-19. Entre os coronavírus, apenas o SARS-CoV-2 causou uma pandemia tão longa, com infecções generalizadas e tantos óbitos, sugerindo que a estrutura molecular desse vírus seja diferente dos outros que acometeram os seres humanos e, portanto, tem sido exaustivamente estudada pela comunidade científica (Liet *al.*, 2020; Zapatero; Barba, 2023; Le *et al.*, 2023).

Após aproximadamente cinco anos do surgimento da doença, ainda não há resposta definitiva para a origem do vírus e embora um hospedeiro intermediário não tenha sido identificado, a hipótese mais aceita é que o vírus seja proveniente de morcegos que transmitiram o vírus a animais selvagens, e esses, posteriormente, a humanos por meio da comercialização de animais vivos, vendidos no mercado de

Wuhan, local onde foram identificados os primeiros casos da doença. Outra hipótese sustenta o escape do vírus de uma instalação de pesquisa científica do mesmo país (Alwine *et al.*, 2023).

2.1.1 Agente etiológico

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavírus*, e seu genoma varia de 26 a 32 quilobase sendo composto por uma fita simples de RNA (ácido ribonucleico) e capsídeo, contendo nucleoproteínas (Luet *al.*, 2020). O SARS-CoV-2 é composto por vários tipos de proteínas, essas podem ser encontradas na membrana como a Spike e a glicoproteína transmembrana, no envelope e no nucleocapsídeo (estrutura que envolve o material genético do vírus). A proteína S possui forte afinidade com o receptor da enzima de conversão da angiotensina 2 (ACE2) que se apresenta de maneira abundante no epitélio pulmonar. Alguns coronavírus possuem também a proteína hemaglutinina-esterase (HE) que formam picos menores no envelope facilitando a entrada do vírus no hospedeiro, além de colaborar na replicação viral (Lu *et al.*, 2020; Mousavizadeh; Ghasemi, 2020; Guo *et al.*, 2020). A figura 1 representa a estrutura do coronavírus.

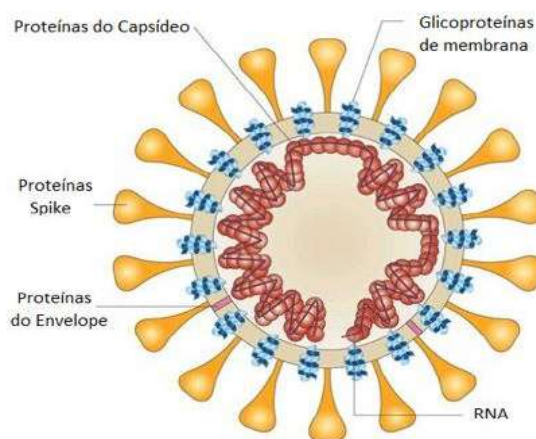


Figura 1: Estrutura do coronavírus
Fonte: adaptada de Peiris, 2004

2.1.2 Mecanismo de ação do vírus e patogênese

A entrada do SARS-CoV-2 na célula é realizada pela ligação da proteína S (Spike) com o receptor de ACE2 (enzima conversora de angiotensina), que é uma proteína de membrana encontrada em órgãos como pulmão, coração, rins e intestino

(Mousavizadeh; Ghasemi, 2020; Lu *et al.*, 2020; Lima; Sousa, 2020). Após essa ligação, a proteína Spike é clivada em duas subunidades denominadas S1 e S2. A subunidade S1 tem a finalidade de se acoplar ao receptor da célula enquanto a subunidade S2 é responsável pela entrada do vírus por meio de seu peptídeo de fusão (FP) que expõe os domínios HR1 (*heptad repeat1*) o qual interage com o domínio HR2 (*heptad repeat 2*) formando feixes denominados 6HB aproximando o vírus e promovendo sua entrada na célula (Lima; Sousa, 2020; Le, 2023). Após a liberação do genoma viral no interior da célula ocorre a tradução para duas proteínas (pp1 e pp1ab) e posteriormente a transcrição do RNA mensageiro em segmentos de polaridade negativa e positiva com codificação de proteínas estruturais. A partir desses processos ocorre a replicação do RNA genômico e composição de novos vírions com liberação de partículas virais por exocitose (Rayeganet *al.*, 2023; Lu *et al.*, 2020; Lima; Sousa, 2020, Xavier *et al.*, 2020).

O RNA viral aciona o sistema imune do hospedeiro que passa a produzir citocinas, interleucinas, quimiocinas, interferons, sendo que a produção excessiva pode gerar danos induzidos pelas citocinas como falência de órgãos, trombose e morte. Ademais, a ativação do sistema imune produz uma resposta positiva com liberação ainda maior de citocinas, interferons e quimiocinas causando danos ainda maiores ao organismo. Devido a característica da proteína Spike em provocar robusta resposta do sistema imunológico, a mesma foi alvo de estudos para desenvolvimento de vacinas (Li. G *et al.*, 2023; Le, 2023). A figura 2 ilustra a entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula.

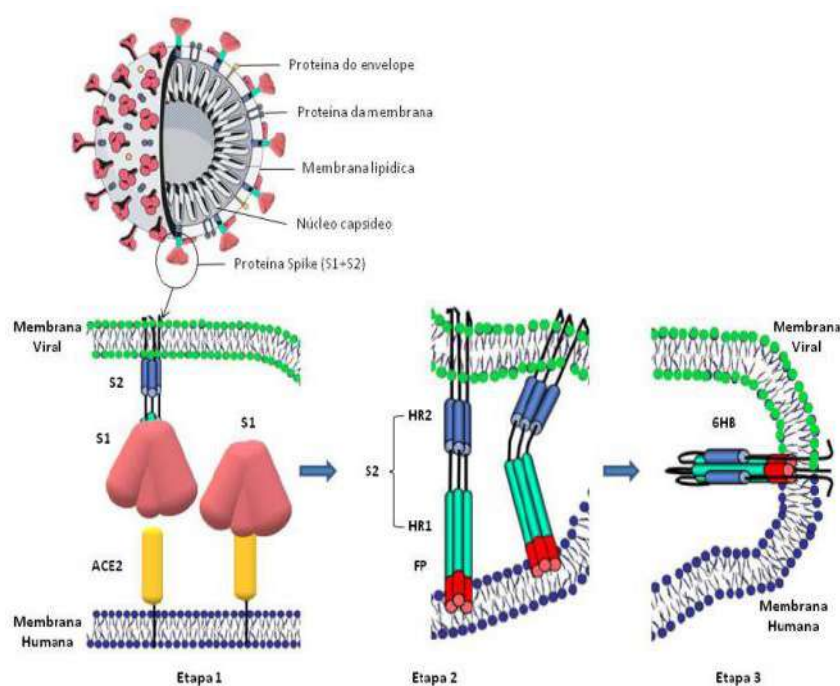


Figura 2: Mecanismo de entrada do SARS-Cov2 na célula
Fonte adaptada:Lima; Sousa, 2020.

2.1.3 Transmissão e manifestações clínicas

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por inalação e contato com partículas contendo vírus, absorvidas por mucosas da boca e nariz através das mãos contaminadas ou pelo ar. A OMS classificou como partículas maiores, gotículas ($>5\ \mu\text{m}$) e menores, núcleos de aerossóis ($\leq 5\ \mu\text{m}$) (Rayeganet *al.*, 2023). Após se instalarna célula hospedeira, ocorre a multiplicação viral e nesse período (especialmente na primeira semana) o indivíduo apresenta alto poder de infectar outras pessoas, mesmo que seja assintomático. Se o sistema imune não conseguir interromper a progressão viral, os vírus alcançam os alvéolos pulmonares que são ricos em ACE2, onde ocorre migração de leucócitos com citocinas, resultando na diminuição ou interrupção de trocas gasosas e pneumonia. Alguns pacientes pioram muito e necessitam de ventilação artificial podendo desenvolver insuficiência respiratória aguda e síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Ademais, outros órgãos podem ser comprometidos causando inúmeros sintomas, como: fígado, rins (insuficiência renal), intestinos (vômitos, diarreia e dor abdominal), sistema nervoso central (acidente vascular cerebral devido a micro trombos) e coração (eventos cardiovasculares como infarto) (Vieira; Emery; Andriolo, 2020). Alguns achados pós morte incluíram danos alveolares, lesão tubular renal, edema cerebral, micro trombose e a presença de SARS-CoV nos pulmões, rins, cérebro e órgãos hematológicos (Lai *et al.*,2020;Kellam; Barclay, 2020;Hanleyet *al.*,2020; Auwaerter, 2020).A figura 3 é a representação esquemática da patogênese do vírus SARS-CoV-2.

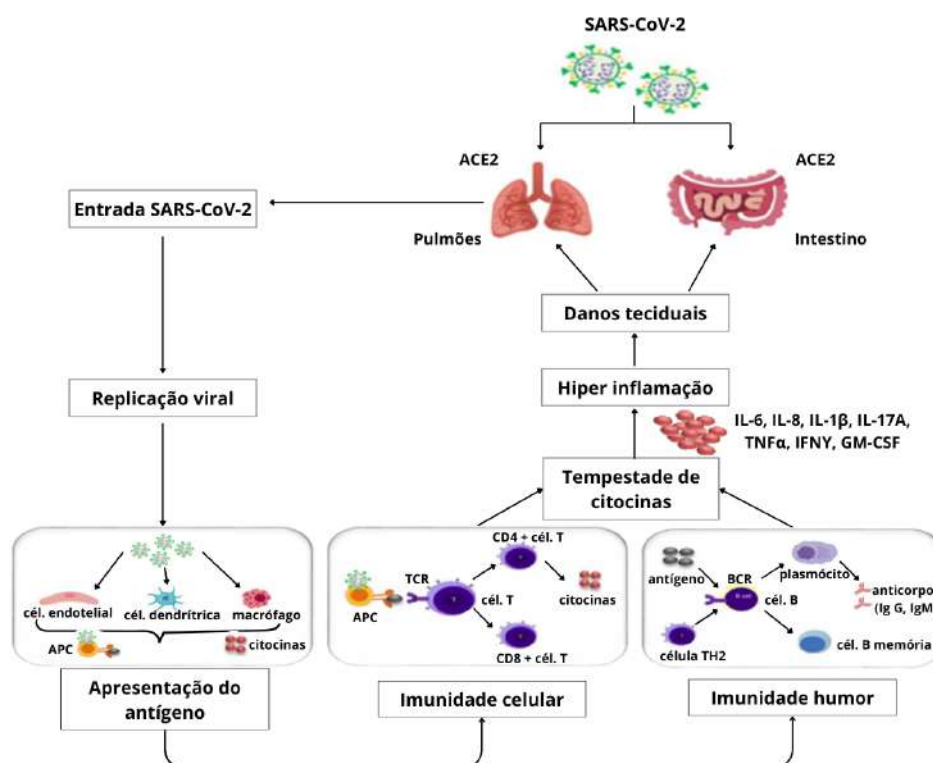


Figura 3: Representação esquemática da patogênese pelo SARS-CoV-2.

Fonte adaptada: Chatterjee 2020

Desde que a OMS declarou a pandemia em 2020, tornou-se fundamental distinguir a COVID-19 de outras doenças sazonais. Para isso, a organização caracterizou alguns sintomas diferenciais para a COVID-19: presença de processo inflamatório na garganta que evolui para tosse seca, espirros, coriza, fraqueza e mal-estar, presença de anosmia (diminuição ou ausência de olfato) e ageusia (diminuição ou ausência do paladar)(OMS, 2020; Ministério da saúde, 2024). Ademais, indivíduos idosos e que apresentam comorbidades como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e afecções respiratórias crônicas devem ser monitorados por apresentar maior probabilidade de desenvolver quadros graves da COVID-19, embora a doença possa sucumbir indivíduos de qualquer idade (OMS 2020; Ministério da Saúde, 2024).

O diagnóstico precoce da COVID-19 contribui para reduzir as chances de transmissão, porém muitos países como no Brasil, o teste é feito apenas em pacientes sintomáticos, deixando de fora uma legião de indivíduos assintomáticos sem diagnóstico, porém, portadores do vírus (Boschiero *et al.*, 2021). A figura 4 representa o número de mortes por ano desde o início da pandemia, enquanto a figura 5 demonstra o número de mortes no Brasil e a tabela 1 separa óbitos por região.

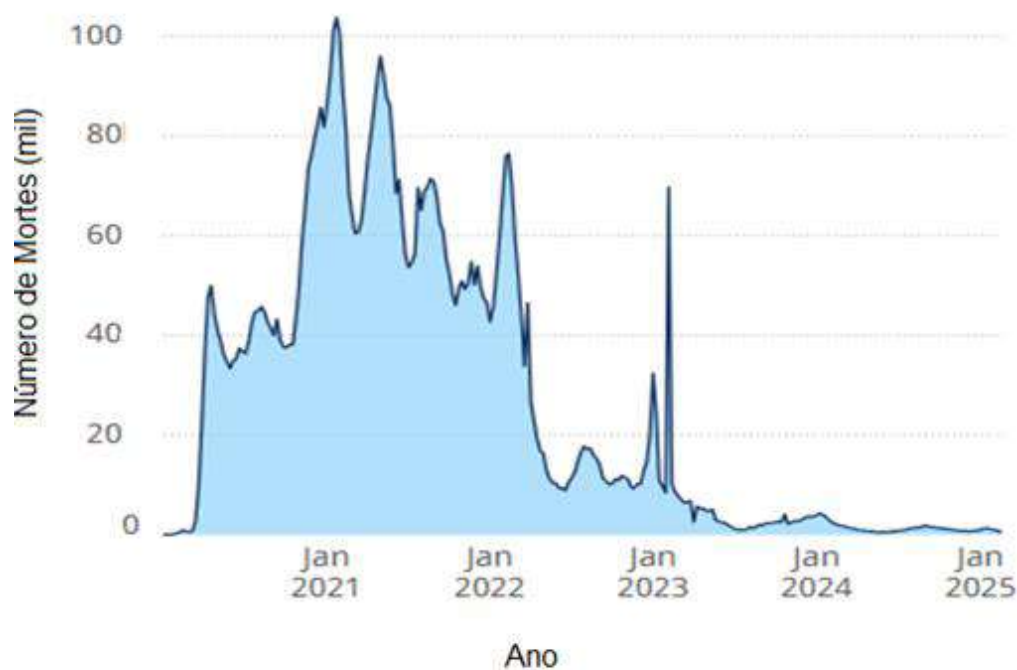


Figura 4: Representação gráfica de mortes por COVID-19 no mundo
 Fonte: Organização Mundial da Saúde acesso em 03/03/2025

Desde 2020, a COVID-19 já matou mais de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil foram mais de 700 mil óbitos com taxa de mortalidade de 330,0 para 100 mil habitantes.

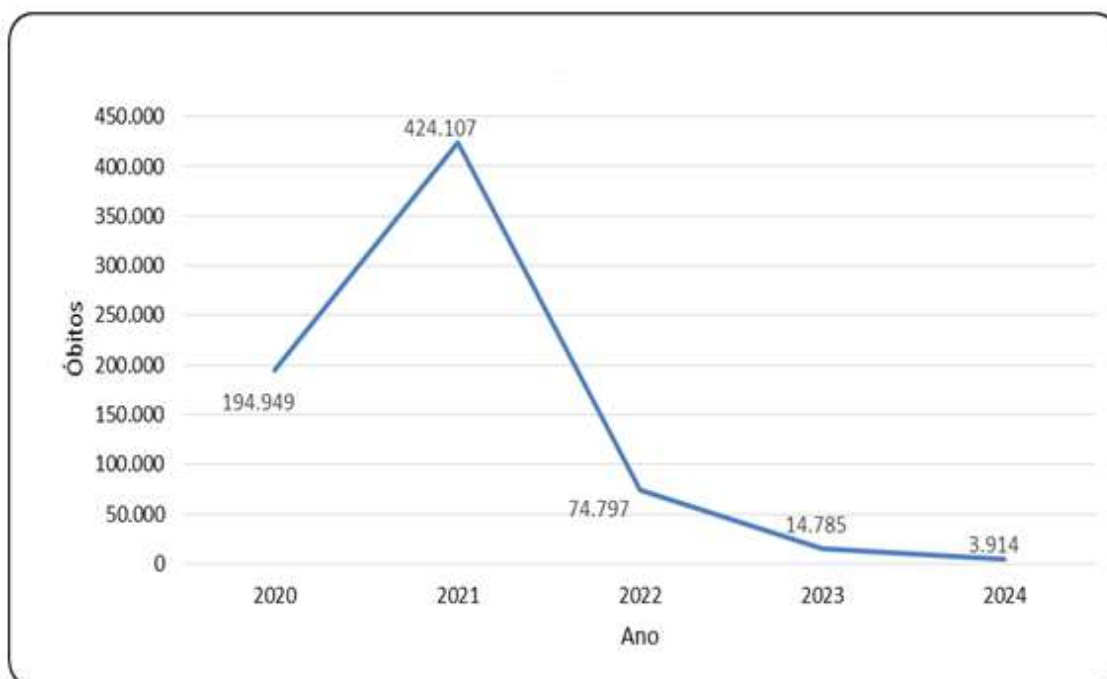


Figura 5: Óbitos por COVID-19 no Brasil entre 2020 e 2024

Fonte: Ministério da saúde consulta em 15-07-2024

Tabela 1- Casos e Óbitos por COVID-19 no Brasil por região

Região	Casos	Óbitos	Óbitos/100 mil habitantes
Sudeste	15.673.714	345.249	340,4
Sul	8.300.176	113.476	378,6
Nordeste	7.623.645	137.140	240,3
Centro oeste	4.603.468	67.203	412,4
Norte	3.003.048	52.193	283,2

Fonte: Ministério da Saúde Consulta em 03/03/2025

2.1.4 Diagnóstico

A técnica padrão-ouro para detecção da COVID-19 é baseada na identificação do material genético do vírus (ácido ribonucleico – RNA) pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase) obtidas por amostras de nasofaringe e orofaringe coletadas com swab, também podem ser usados materiais do trato respiratório inferior como escarro, aspirado traqueal ou lavado brônquico, alguns estudos indicam a presença do vírus também na saliva, fezes e sangue (Long *et al.*, 2020; Duong; Wright; Justman, 2020; Auwaerter, 2020; Wang, 2020).

A RT-PCR tem como princípio a detecção e quantificação de fluorescência emitida em cada ciclo da reação, sendo altamente sensível na detecção de poucas cópias do material genético. Para que esse processo ocorra é necessário fazer a transcrição do RNA para DNA complementar, por meio de um processo denominado transcrição reversa ou RT. Após esse processo, a amostra é colocada em placas contendo poços junto com os reagentes específicos que se intercalam nas fitas do DNA. Um software é usado para construir um gráfico relacionando os ciclos com a intensidade da fluorescência, revelando o resultado após término da reação (Vieira; Emery; Andriolo, 2020). A figura 6 representa o princípio da técnica de RT-PCR.

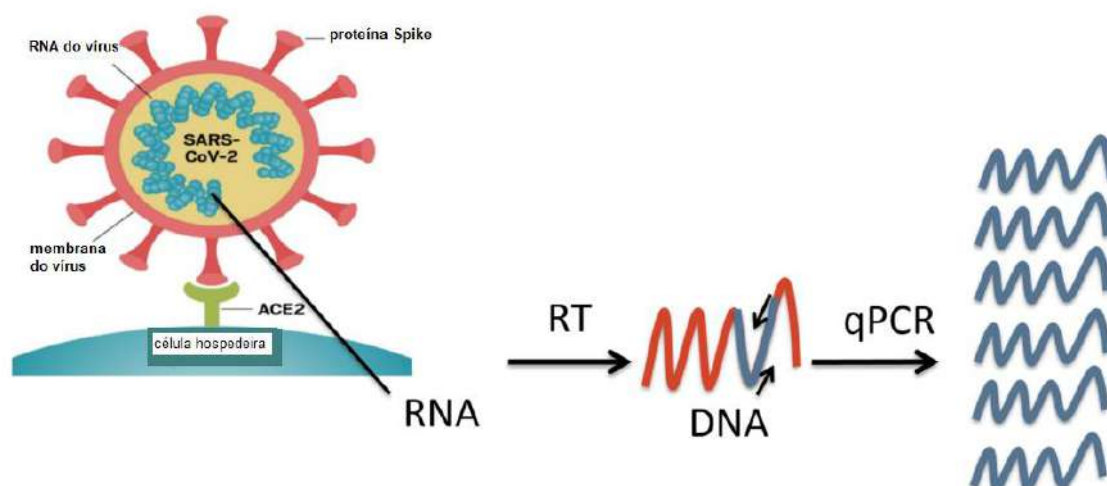


Figura 6: Princípio da técnica RT-PCR para COVID-19

Fonte: Igenomix modificado. <https://www.igenomix.com.br/genomics-precision-diagnostic/>

Durante a pandemia, o Brasil enfrentou diversas fases com aumento dos casos de COVID-19 (ondas) e com elas inúmeras dificuldades para o diagnóstico. Embora a RT-PCR seja o teste de escolha e padrão ouro, possuem algumas limitações como a

necessidade de espaço físico específico e pessoal treinado para extração do material genético sendo que, no início da pandemia, apenas alguns laboratórios escolhidos pela OMS poderiam realizar o teste (Fiocruz no Rio de Janeiro, Instituto Adolfo Lutz em São Paulo e Instituto Evandro Chagas no Pará). Ademais, havia a possibilidade de resultados falsos, especialmente devido ao pré-analítico como coletas inadequadas e degradação do material genético, posteriormente os testes passaram a ser realizados também em rede privada, porém com preços elevados (Instituto Adolfo Lutz – protocolo, 2021). Outros fatores de impacto quanto a RT-PCR é o tempo de liberação que são maiores quando comparado a outros testes laboratoriais, gerando morosidade na liberação dos resultados (Bastos; Tavaziva; Abidi, 2020; Xavier *et al.*, 2020; Pavão *et al.*, 2020; Auwaerter, 2020; Barberia *et al.*, 2023).

Com o avanço da pandemia e as orientações da OMS sobre testagem em massa das populações, as empresas voltadas aos diagnósticos laboratoriais desenvolveram testes para pesquisa de antígeno e anticorpos relacionados ao SARS-CoV-2, entre eles o teste de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) utilizando a metodologia de quimioluminescência. Esses ensaios são usados na detecção de anticorpos de diferentes classes como: IgA, IgM que são indicadores da fase aguda da doença e o IgG da infecção pregressa, embora mais ágeis e com menor custo que o RT-PCR, possuem como limitação, menor sensibilidade e especificidade, além da possibilidade em ocorrer reações cruzadas com outros coronavírus. Ademais, a produção de anticorpos demanda um período entre 7 a 10 dias após início da sintomatologia, período onde o indivíduo transmite o vírus. Esses testes usam como material biológico o sangue total, soro ou plasma (Pavão *et al.*, 2020; Auwaerter, 2020; Vieira; Emery; Andriolo, 2020).

Durante este período, foram desenvolvidos testes rápidos ou testes laboratoriais remotos (TLR) que utilizam a metodologia de imunocromatografia para a detecção de anticorpos IgG e IgM em amostras de sangue e que podem ser utilizados como ferramenta de triagem tanto para pacientes sintomáticos quanto assintomáticos com sensibilidade de 88,7% e especificidade de 90,6% (Li *et al.*, 2020). Posteriormente, outro teste foi disponibilizado, com possibilidade de detectar os antígenos virais utilizando como amostras a secreção de orofaringe e nasofaringe (Vieira; Emery; Andriolo, 2020). Em 2022 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), liberou a comercialização de autotestes que possuem o mesmo princípio do teste rápido na detecção de antígenos, esse dispositivo pode ser encontrado em farmácias.

2.1.5 Prevenção e tratamento

Até dezembro de 2020, os tratamentos para a COVID-19 eram direcionados para o aumento da imunidade, alívios dos sintomas e terapias de suporte como oxigênio terapia, porém a comunidade científica estava envolvida no desenvolvimento de uma vacina a fim de conter a propagação da doença (Attia *et al.*, 2021).

A vacinação é o método mais eficaz para prevenir doenças infecciosas ou minimizar seus sintomas e muitas abordagens são descritas para o seu desenvolvimento, desde atenuação e inativação, bem como manipulação de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos (Plotkin, 2005). No dia 08 de dezembro de 2020, o Reino Unido foi o primeiro país ocidental a utilizar uma vacina aprovada para uso emergencial contra a COVID-19 e pouco tempo depois outros países como Canadá, Estados Unidos e União Europeia aprovaram o uso do imunizante. No Brasil a primeira vacina contra a COVID-19 foi aplicada em 17 de janeiro de 2021, sendo autorizadas pela ANVISA as marcas AstraZeneca, CoronaVac, Janssen e Pfizer. A partir de abril de 2021 com o esquema vacinal consolidado, o Brasil baixou em 67% a média móvel de óbitos por COVID-19 até o mês de agosto de 2021 e em julho de 2024, já foram aplicadas 520.223.342 doses da vacina no país (Ministério da Saúde, 2024; Associação Médica Brasileira, 2021; Attia *et al.*, 2021). Em 05 de maio de 2023 a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional.



Figura 7: Relação entre esquema vacinal e queda da média móvel de óbitos no Brasil entre abril e agosto de 2021

Fonte: Ministério da Saúde

2.2 Espectroscopia Raman

A teoria de que a luz e a cor do céu são resultados do espalhamento pelas moléculas da atmosfera foi bem estabelecida por Rayleigh e Cabannes. Em 1928 o indiano Chandrasekhara Venkata Raman fez uma nova descoberta, demonstrando que a luz é dispersa pelas moléculas em líquido e gases sem poeira, e o retorno do feixe incidente é acompanhado por uma radiação dispersa de frequência degradada que ele denominou de “novo tipo de radiação secundária”. Essa descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1930 (Raman; Krishnan, 1928).

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica que investiga mudanças nos níveis vibracionais moleculares, quando ocorre interação entre o fóton e a matéria, induzindo alterações energéticas. A interação entre fóton e matéria causa transições nos estados energéticos que podem ser: a) eletrônicas geralmente na região ultravioleta ou visível, b) rotacionais abrangendo a faixa do micro-ondas, c) translacionais e vibracionais que se situam na faixa visível do infravermelho ou infravermelho próximo (Sala, 2011; Santos *et al.*, 2019).

No espalhamento inelástico denominado Raman, um fóton excita a molécula de um estado vibracional eletrônico fundamental para um estado virtual (intermediário), seguido pelo retorno ao nível fundamental, sendo o tempo decorrente desse processo em torno de 10^{-15} segundos (Santos *et al.*, 2019). Ao retornar ao estado fundamental o espalhamento pode ocorrer de três formas:

- Espalhamento elástico Rayleigh: a energia do fóton se mantém inalterada, mesmo após a interação com a matéria, ou seja, não há alteração do comprimento de onda da radiação espalhada
- Espalhamento inelástico Stokes: moléculas no estado fundamental absorvem parte da energia do fóton incidente e são excitadas para um estado vibracional ou eletrônico mais alto. Isso faz com que a radiação espalhada apresente menor energia ou (maior comprimento de onda) do que a radiação incidente;
- Espalhamento inelástico anti-Stokes: moléculas excitadas em um estado vibracional ou eletrônico mais alto transferem parte de sua energia para o fóton

incidente. Isso faz com que a radiação espalhada apresente maior energia ou (menor comprimento de onda) do que a radiação incidente.

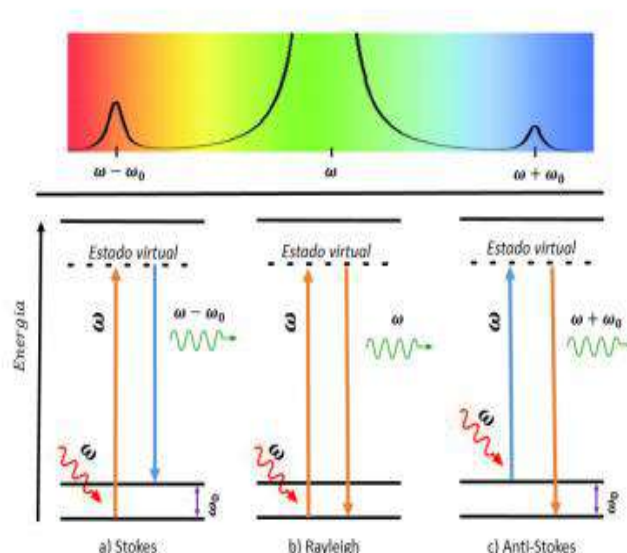


Figura 8: Esquema da transição entre os níveis de energia molecular e suas bandas Raman correspondente. (a) Espalhamento inelástico Raman Stokes, (b) espalhamento elástico Rayleigh, (c) espalhamento inelástico Raman Anti-Stokes.

Fonte: Cho *et.al.* 2020

As diversas formas de espalhamento, representadas na Figura 8 formam um número de picos conhecidos por espectros Raman, onde linhas espectrais são obtidas em função das frequências vibracionais denominadas deslocamentos Raman (*Raman shifts*) que são expressas em cm^{-1} enquanto a intensidade é expressa em unidades de contagens arbitrárias. Os espectros Raman refletem a impressão digital única de cada molécula. (Faria; Santos; Gonçalves, 1997).

A sobreposição de picos Raman forma bandas espectrais, fornecendo informações sobre os modos vibracionais, deslocamento Raman e possíveis alterações estruturais das moléculas (Pezzotti, 2021).

A análise por espectroscopia Raman requer pré-processamento geralmente realizado em três etapas: remoção dos raios cósmicos, suavização do sinal e subtração da linha de base. Os polinômios e algoritmos são os mais utilizados na extração da fluorescência enquanto os raios cósmicos podem ser extraídos manualmente, atualmente algoritmos usando filtragem morfológica matemática têm sido implementados com sucesso na correção de linha de base, reconhecimento de picos e remoção de raios cósmicos, outros estudos usando aprendizado de máquina têm sido aplicados de forma eficiente para a ciência analítica (Pavelka; Hemzal; Hrbac, 2023).

A espectroscopia Raman tem sido usada com sucesso na identificação de substâncias desconhecidas em ciências de materiais, no campo da medicina caracterizando fluidos biológicos, na medicina forense e criminalística com análise de traços de disparos e reconhecimento de drogas ilícitas. Ademais, na área de diagnóstico, a técnica possui elevada sensibilidade e especificidade quando comparada aos padrões ouro de diagnóstico, com a vantagem de não usar reagentes e não destruir o material a ser analisado (Qi *et al.*, 2023).

2.2.1 A espectroscopia Raman na análise de materiais biológicos

Os métodos de análise por espectroscopia Raman têm sido amplamente estudados por oferecer diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, entre eles: rapidez na obtenção de informações precisas a nível molecular, a utilização de quantidade mínima de amostras e por não usar reagentes. Em uma revisão bibliográfica foram descritos avanços significativos com aumento no número de pesquisas utilizando a espectroscopia Raman em diversos tipos de cânceres e doenças infecciosas, revelando alta sensibilidade e especificidade do método (Paraskevaidiet *al.*, 2021; Krafft, 2015; Delrue, 2022). A nefropatia diabética é uma das complicações em pacientes diabéticos e seu diagnóstico convencional baseia-se em exames laboratoriais e biópsia renal que é um método invasivo. A ER demonstrou grande potencial em seu diagnóstico com precisão de 93,3%, sensibilidade de 87,5% e especificidade de 100%. Ademais, outro estudo distinguiu indivíduos saudáveis de indivíduos diabéticos com hipertensão arterial (Carlomagno *et al.*, 2021; Everton *et al.*, 2022). Um estudo de revisão demonstrou que a ER é capaz de detectar e identificar bactérias rapidamente, especialmente quando combinadas às técnicas de concentração do microrganismo, além disso possibilita resultados mais rápidos que nos métodos convencionais, auxiliando o clínico em um tratamento efetivo (Rodriguez; Zhang; Wang, 2023).

Diversos são os materiais biológicos que podem ser usados na ER, entre eles o sangue, urina, saliva, tecidos e outros fluidos biológicos resultando em espectros característicos das biomoléculas (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos) que compõem o material analisado. Ademais, o uso combinado da ER e análises multivariadas produz melhor resultado no reconhecimento de padrões fornecendo maior precisão e diferenciação na classificação de amostras biológicas (Sirajet *al.*, 2021).

2.2.2 Aplicações da espectroscopia Raman às doenças virais

A mpox é transmitida pelo vírus monkeypox, por meio de contato com sangue, fluidos corporais, lesões na pele ou mucosa de animais e principalmente por gotículas respiratórias. A OMS alertou em junho de 2024 para uma variante mais perigosa devido à mutação viral e os dados indicam uma taxa de 10% de letalidade entre crianças na África Central. Até abril de 2024 foram registrados 97.208 casos da doença no mundo, com 186 óbitos confirmados. O Brasil é um dos dez países com mais casos (11.212), atrás apenas dos EUA que contabilizam 32.820 casos (OMS, 2024). Sabendo da necessidade de métodos rápidos para detecção da doença, foram desenvolvidos estudos utilizando espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS), que apresentaram resultados promissores com detecção mínima de 100 cópias/mL, sendo útil para construir uma curva espectral relacionando a intensidade do pico com concentração de proteína e ácido nucleico (Zhang *et al.*, 2023; Lukose, 2023).

A hepatite B é uma das principais causas de carcinoma e cirrose hepática. Os métodos convencionais de análise, demandam vários marcadores sorológicos para um resultado completo. Em um estudo utilizando amostras de soro e a metodologia de espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS), foi observada sensibilidade maior que o requisito clínico, além de uma especificidade de 100% na detecção do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) (Xuet *et al.*, 2024; Ramojiet *et al.*, 2022).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi alvo de um trabalho utilizando SERS onde foram identificadas distinções em bandas espectrais para o vírus. Enquanto os picos 562 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 1094 cm^{-1} estavam presentes nas amostras negativas e positivas, os picos 421 cm^{-1} , 1069 cm^{-1} e 1254 cm^{-1} foram observados apenas nas amostras de HIV, afirmando que a técnica pode ser usada para identificar estruturas moleculares e biomacromoléculas que podem ser exploradas como biomarcadores na triagem do HIV (Anwar *et al.*, 2023; Demoliou, Papaneophytou, Nicolaidou 2022).

A COVID-19 foi alvo de inúmeras pesquisas devido a sua relevância em escala global. Em estudos realizados em 2021, utilizando espectroscopia Raman e laser infravermelho, foi possível caracterizar a localização do vírus e produtos associados a resposta do hospedeiro contra a infecção, demonstrando que a ER é um método que fornece informações úteis sobre as moléculas do vírus e deve ser aprimorado em estudos futuros (Rumalinget *et al.*, 2022, Goulart *et al.*, 2022).

2.3 Ferramentas estatísticas para análises espectrais

Os dados amostrais possuem informações relevantes acerca dos materiais analisados e deverão ser extraídos por meio dos métodos matemáticos e estatísticos. O pré-tratamento de dados tem a finalidade de corrigir artefatos que interferem no experimento, mas que não são dependentes da amostra, como os raios cósmicos. O pré-processamento é usado para o aprimoramento da linha de base como: suavização, correção, normalização e dimensionalidade. Após esses processos deve-se construir o modelo analítico onde os dados serão analisados (Ryabchykov, 2019).

2.3.1 Análise de componente principal (PCA)

A análise de componente principal (PCA) é um método estatístico que possui a finalidade de reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados. Essa ferramenta permite a identificação de padrões ao transformar as variáveis originais em um conjunto menor de variáveis denominadas componentes principais (PCs). Os PCs são subdivididos e a maior variação espectral é armazenada no PC1, a extração das variações seguem sucessivamente até o componente de menor variância. Os dados originais escalonados em uma menor dimensão representam uma combinação linear das variáveis originais, enquanto os escores indicam os valores das amostras nesses novos eixos. Os escores ajudam a visualizar a distribuição e separação das amostras graficamente enquanto os *loading* mostram a contribuição de cada variável para o componente principal, ou seja, quanto cada variável original carrega no componente principal. A combinação entre PCs, escore e *loading* permite identificar de maneira aprofundada os componentes relevantes das amostras (Varmuza; Filzmoser, 2016; Hall, Muller, Wang, 2006).

2.3.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS – *partialleastsquares*) e PCA

A ferramenta estatística PLS é utilizada para encontrar um modelo de regressão linear, gerando novas variáveis que serão usadas na classificação e discriminação da amostra. A PLS permite separar as amostras em regiões bem definidas graficamente, baseada no número de vezes que se repetem e que estão contidas nos componentes

principais, ou seja, além de reduzir os dados também maximiza a separação de diferentes classes como saudáveis e doentes.

Com a aplicação da regressão dos mínimos quadrados parciais obtém-se novos componentes denominados latentes, que são combinações lineares das variáveis originais. Estes componentes possuem maior poder de diferenciação entre classes, auxiliando na criação de modelos para classificar novas amostras com base nos dados espectroscópicos (IBM SPSS Statistics 30.0.0”, 2024).

A PLS necessita de duas etapas: calibração e validação. A calibração tem como finalidade distinguir as classes com base nas características dos dados. Nessa etapa um conjunto de dados conhecidos é usado para construção do modelo que relaciona as variáveis preditoras (espectros Raman) com as classes em estudo. A validação tem por finalidade assegurar que o modelo seja robusto e confiável na classificação das amostras. Nessa etapa o modelo é testado usando um conjunto de dados que não foi usado na calibração, permitindo avaliar se o modelo funciona de maneira adequada para novos dados, capturando padrões reais que podem ser aplicados a novas amostras. Uma das ferramentas que pode ser utilizada na validação é a *leave-one-out*, onde cada amostra do conjunto de dados é usada somente uma vez, enquanto o restante das amostras são usadas para formar um novo modelo, então, a amostra inicialmente extraída é inserida novamente ao conjunto de dados para definir sua correlação com os demais dados, e assim calcular o erro de previsão. Para uma validação completa, todas as amostras devem ser excluídas, uma a uma, e posteriormente reinseridas para formação dos modelos de classificação. Para discriminar os componentes que possuem diferenças significativas entre os grupos, pode-se aplicar um intervalo de confiança (valor de p). Essa ferramenta auxilia na distinção do diagnóstico e classificação (Paraskevaidiet *al.*, 2021; Nunes *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Esse trabalho de pesquisa foi elaborado com atenção aos preceitos éticos e foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi - UAM, que emitiu parecer consubstanciado aprovando o projeto com o certificado de apresentação de apreciação ética 26691419.6.0000.5492. (APÊNDICE A)

O desenho do estudo é apresentado em um fluxograma na Figura 9, onde pode-se obter todas as fases do processo, tendo o seu curso iniciado pelas amostras sanguíneas submetidas às técnicas laboratoriais convencionais, depois a espectroscopia Raman, até o resultado da análise estatística, permitindo a identificação das diferenças na composição bioquímica das amostras estudadas e a discriminação dos grupos.

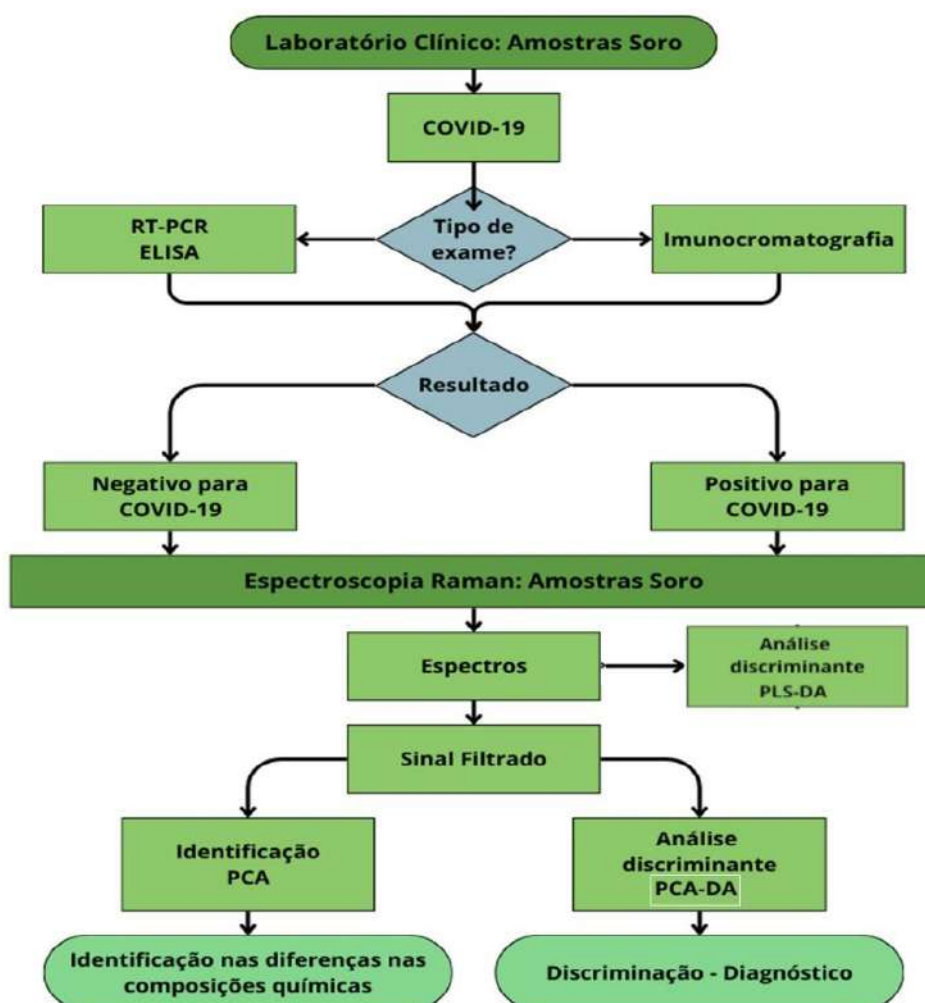


Figura 9: Desenho do estudo

3.2 Amostras de soro

As amostras de nasofaringe (usadas apenas nos testes convencionais) e sangue (usadas no teste convencionais e espectroscopia Raman) foram obtidas no laboratório de análises clínicas CIPAX Medicina Diagnóstica localizado na cidade de São José dos Campos, SP.

3.2.1 Amostras de soro usando a técnica RT-PCR

Foram selecionados 20 indivíduos, entre eles 10 apresentaram resultado positivo em: teste RT-PCR (orofaringe) + ELISA (soro) para COVID-19 enquanto 10 amostras apresentaram-se negativas para esses testes.

Para as amostras de RT-PCR, a secreção de nasofaringe e sangue foram coletadas entre o terceiro e o décimo dia após o início dos sintomas como dor de garganta, febre, tosse, anosmia, coriza, cefaleia, falta de apetite, dor abdominal, dor no corpo e pneumonia. As amostras de nasofaringe e orofaringe foram coletadas por meio de dois swabs de poliéster e imediatamente colocadas em tubo com tampa de rosca contendo 3 mL de solução de salina estéril (swab e tubo Kolplast, São Paulo, SP). Os tubos foram transportados em posição vertical à temperatura entre 2° a 8°C até o processamento das amostras (Instituto Adolfo Lutz, 2020; Abbott, 2020; SBPC, 2020).

3.2.2 Amostras de soro usando Imunocromatografia

Foram selecionados 94 indivíduos, entre eles 40 apresentaram resultado positivo no teste imunocromatográfico separados em IgM (06), IgM+IgG (13) e IgG (21), enquanto 54 amostras apresentaram-se negativas para esse teste.

Todas as amostras foram provenientes de pacientes assintomáticos que realizavam outros exames laboratoriais.

3.2.3 Coleta e preparo das amostras de soro

O sangue total foi coletado por punção venosa em sistema fechado utilizando tubos contendo gel separador (Vacutainer®, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA), que foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 3.000 rotações por minuto

(RPM) para separação do soro, utilizando a centrífuga modelo Elektra, Laborline, São Paulo, SP, Brasil. As amostras de soro foram usadas para os testes moleculares usando o kit (Abbott Real-Time SARS-CoV-2 da marca Abbott Laboratories, São Paulo, Brasil) com sensibilidade de 95% e especificidade de 100%, testes imunológicos usando a metodologia ELISA (kit EuroimmunAnti SARS-CoV-2 ELISA e equipamento EuroimmunAnalyzer I, Euroimmun Brasil, São Caetano do Sul, SP, Brasil), e imunocromatográficos utilizando o kit teste rápido OnSite™ COVID-19 IgM/IgG (CTK Biotech Inc., Poway, CA, EUA) com sensibilidade de 78,0% e especificidade de 99,4% para IgM, sensibilidade de 96,8% e especificidade de 100% para IgG (Ejazi S.A, 2021).

Estas amostras foram congeladas e acondicionadas em caixas térmicas e transportadas ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE) para a realização dos ensaios.

No laboratório de Espectroscopia Raman, as amostras foram descongeladas e então separadas em grupos nomeados de Grupo Controle e Grupo COVID-19, com suas quantidades apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de amostras de soro para a espectroscopia Raman

Grupo	Quantidade de amostras obtidas
Controle	64
COVID-19	50

3.3 Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento

Os espectros Raman foram obtidos das amostras de soro, que foram homogeneizadas e pipetadas em um porta-amostras de alumínio contendo furos. Para a pipetagem foi utilizada uma micropipeta monocal de volume variável (model P200, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA) e aspirado 80 µL da amostra.

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo no infravermelho próximo (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), conforme diagrama esquemático e foto do equipamento apresentados na Figura 10. O espectrômetro utiliza laser de diodo em 830 nm como fonte de excitação, acoplado a uma sonda Raman por um cabo de fibras ópticas, obtendo-se 350 mW de potência laser

na saída de excitação da sonda Raman. O espalhamento da amostra foi coletado pela sonda Raman e acoplado ao espectrômetro para dispersão. O espectrômetro possui grade de difração de 1.200 linhas/mm que promove a dispersão da luz espalhada na faixa espectral entre 400 e 1800 cm^{-1} , e a direciona ao detector *backthinned, deep-depletion* CCD (*charge coupled device*) de 1340x100 pixels, refrigerada por Peltier a -75 °C, fornecendo resolução espectral de aproximadamente 4 cm^{-1} . O tempo de exposição para a obtenção dos espectros foi de 30 segundos (3 segundos de varredura e 10 acumulações) e cada amostra foi analisada em triplicata visando aumentar o número de espectros no modelo de diagnóstico. Foram adquiridos um total de 189 espectros normais (controles) e 149 espectros COVID-19.

Os dados armazenados no computador foram submetidos a pré-processamento para subtrair a linha de base devido ao fundo de fluorescência e espalhamento e, para isso, um polinômio de 7ª ordem foi ajustado a todo o intervalo do espectro e subtraído. Os raios cósmicos foram removidos manualmente e os espectros normalizados pela área sob a curva (normalização de 1 norma). O pré-processamento faz-se necessário para reduzir possíveis interferentes coletados durante a aquisição dos espectros e com isso maximiza os sinais importantes que são obtidos para análise posterior. A Figura 10 mostra a fotografia e o modelo esquemático do espectrômetro, enquanto a Figura 11 mostra um exemplo de um espectro de soro com a remoção do sinal de fluorescência de fundo por subtração de um polinômio de ordem 7.

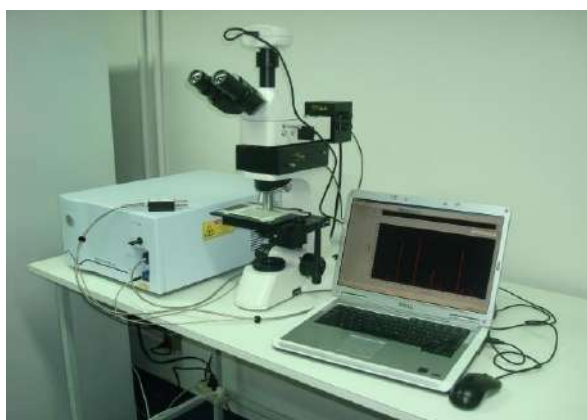
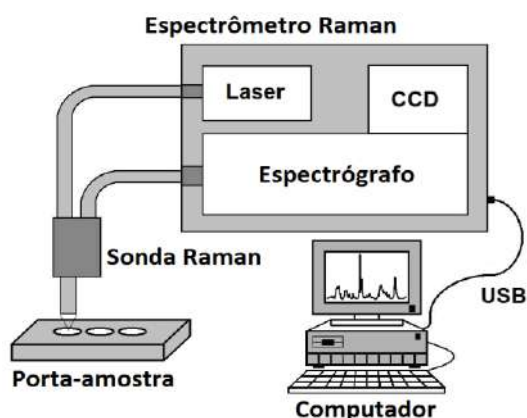


Figura 10: esquerda: diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P-1). A direita: foto do aparelho Raman dispersivo.

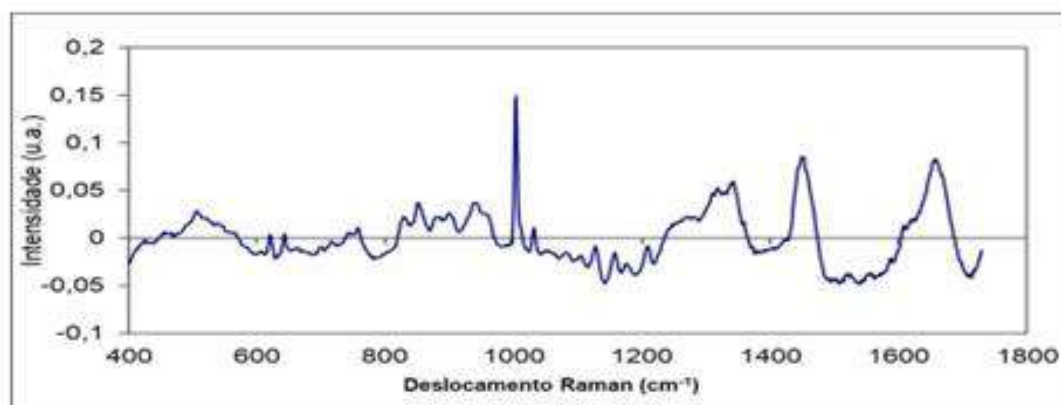


Figura 11: Exemplo de um espectro Raman de soro sanguíneo após remoção de fluorescência de fundo por polinômio de ordem 7 ajustado em toda a faixa.

3.4 Análise de componente principal (PCA) e mínimos quadrados parciais (PLS) para extração de características (análise exploratória) e discriminação

Os espectros Raman foram submetidos à análise de PCA a fim de revelar as diferenças espectrais entre os grupos. Essas diferenças são sugestivas das mudanças na constituição bioquímica devido a doença COVID-19 (análise exploratória). As variáveis da PCA, cargas dos componentes principais (PCs) foram usados na análise discriminante (DA) e esse modelo foi implementado por meio de regressão dos mínimos quadrados parciais PLS usando todas as informações espectrais e não apenas os PCs selecionados. Modelos multivariados como PCA e PLS foram usados para classificação de espectros Raman de soros em normais e anemias e para quantificação de analitos sanguíneos em soro humano para diagnóstico (Giansante *et al.*, 2022).

A extração das características dos componentes principais foram realizadas no Matlab® 7.4.0 (R2007a) (Mathworks Inc., Natick, MA, EUA). As variáveis PCA escores e *Loadings* (PCs) foram extraídas usando o conjunto de dados, considerando cada espectro uma amostra; os escores se assemelham aos espectros Raman e representam o eixo da variância espectral (em ordem de aparecimento), e os PCs representam as intensidades de cada escore no espectro original. Os modelos de análise discriminante usando PCA e PLS (PCA-DA e PLS-DA) foram realizados usando a rotina Chemoface (www.ufla.br/chemoface/) usando a validação cruzada *leave-one-out* (Nunes *et al.*, 2012). A discriminação foi testada sem tratamento e com filtro de derivada de primeira ordem.

3.4.1 Espectroscopia Raman comparadas ao RT-PCR – ferramentas estatísticas

Foram aplicados vários testes estatísticos como:

- Normalidade de Kolmogorov-Smirnov: utilizado para determinar se a amostra estudada possui distribuição normal no gráfico (distribuição gaussiana), avaliando a distância entre a distribuição normal previamente conhecida em relação à da amostra estudada. Esse estudo pode gerar uma hipótese nula, onde ($p > 0,05$) e a amostra segue a distribuição normal, enquanto a outra hipótese, denominada alternativa, o ($p < 0,05$) indicando que a amostra não segue a distribuição normal.
- Teste t de Student: usado para comparar médias entre dois grupos e verificar se as diferenças entre eles é estatisticamente significativa, enquanto o teste t de Student com correção de Welch é uma versão modificada do teste t para amostras independentes, sendo usado quando as variâncias dos dois grupos não podem ser consideradas iguais ou quando os tamanhos das amostras são muito diferentes;
- Teste U de Mann-Whitney: é um teste não paramétrico usado para comparar duas amostras independentes, verificando se as distribuições entre as amostras diferem significativamente.

3.4.2 Espectroscopia Raman comparada ao teste de Imunocromatografia – ferramentas estatísticas

Foram aplicados vários testes estatísticos como:

- Normalidade de Kolmogorov-Smirnov: esse teste é utilizado para determinar se a amostra estudada possui distribuição normal no gráfico (distribuição gaussiana), avaliando a distância entre a distribuição normal previamente conhecida em relação à da amostra estudada. Esse estudo pode gerar uma hipótese nula, onde ($p > 0,05$) e a amostra segue a distribuição normal, enquanto a outra hipótese, denominada alternativa, o ($p < 0,05$) indicando que a amostra não segue a distribuição normal;
- Teste t de Student: usado para comparar a média entre dois grupos e verificar se a diferença entre elas é estatisticamente significativa, enquanto o teste t de Student com correção de Welch é uma versão modificada do teste t para amostras

independentes, sendo usado quando as variâncias dos dois grupos não podem ser consideradas iguais ou quando os tamanhos das amostras são muito diferentes;

- Teste U de Mann-Whitney: também chamado de teste de Wilcoxon para amostras independentes, e se trata de um teste não paramétrico usado para comparar duas amostras independentes e determinar se suas distribuições são significativas;

- ANOVA ou Kruskal-Wallis: o teste ANOVA é um método estatístico paramétrico, usado para comparar a média dos resultados entre diferentes grupos, além de gerar um teste de hipótese que estabelece se há diferença entre elas. Ademais, o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) é utilizado como alternativa ao teste ANOVA quando a distribuição é não-gaussiana. O valor considerado significativo entre os grupos $p < 0,05$.

3.4.3 Associação dos dados para elaboração de um modelo de validação utilizando todas as amostras (RT-PCR e Imunocromatografia)

A média de todos os espectros obtidos nos experimentos, separados entre Negativo para COVID-19 e Positivo para COVID-19 foram compiladas. Os modelos de análise discriminante usando PCA-DA e PLS-DA foram realizados usando a rotina Chemoface e aplicando validação cruzada *leave-one-out*.

4 RESULTADOS

Foram coletadas 114 amostras de sangue e posteriormente processadas por meio de centrifugação, para a extração do soro. Destas amostras, 20 foram submetidas à técnica de RT-PCR, resultando em 10 resultados positivos para COVID-19 e 10 resultados negativos para COVID-19. Em outro momento foram coletadas 94 amostras e submetidas à técnica de imunocromatografia resultando em 40 resultados positivos para COVID-19 e 54 resultados negativos para COVID-19. As amostras foram analisadas por espectroscopia Raman onde foram obtidos um total de 60 espectros para amostras provenientes do teste RT-PCR separadas em 30 positivas para COVID-19 e 30 negativas para COVID-19, enquanto para as amostras provenientes do teste imunocromatografia foram obtidos 278 espectros, sendo 119 positivos para COVID-19 e 159 negativos para COVID-19.

A figura 12 apresenta os espectros Raman médios das amostras nos grupos controle e COVID-19 para o experimento utilizando a metodologia Imunocromatografia enquanto a figura 13 revela os resultados obtidos para as amostras testadas por RT-PCR.

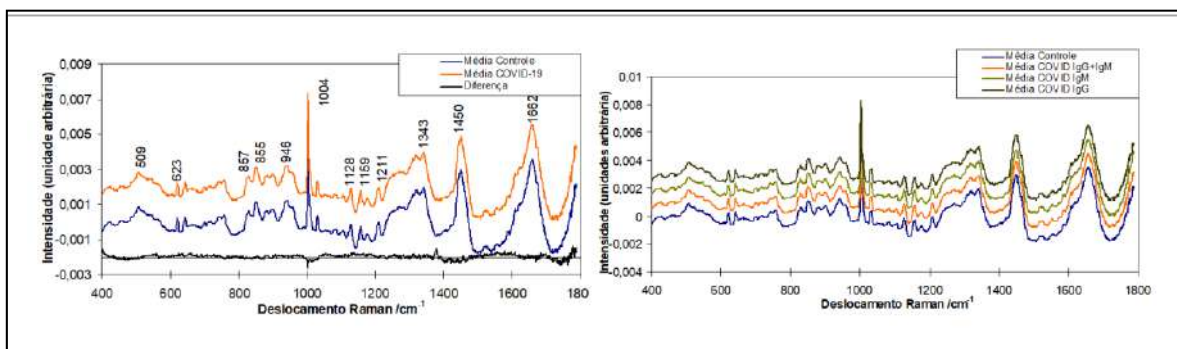


Figura 12: Médias dos espectros Raman obtidas a partir de amostras de soro negativos (grupo controle) e positivos (COVID-19), diagnosticados por imunocromatografia. A direita separados por imunoglobulina.

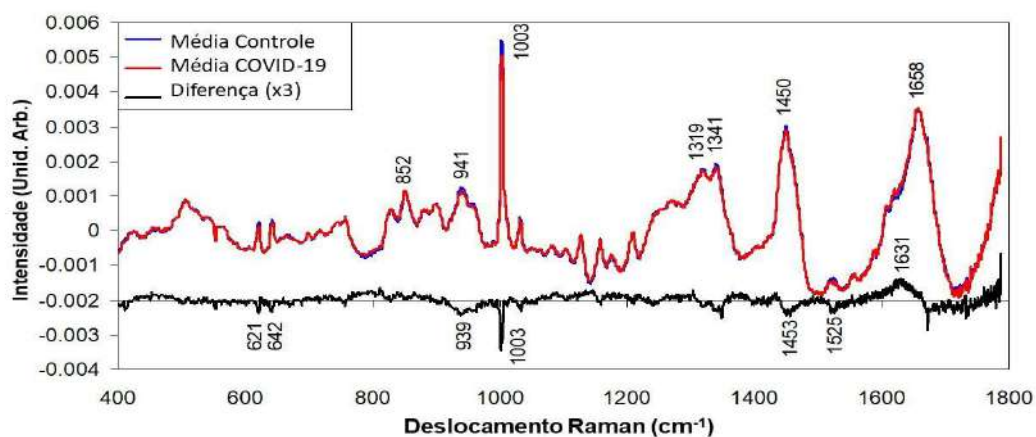


Figura 13: Médias dos espectros Raman obtidas a partir de amostras do soro negativos e positivos para COVID-19 diagnosticados por RT-PCR, bem como os espectros de diferença (COVID-19 e controle).

Ambos os espectros mostram características Raman atribuídas aos constituintes do soro, especialmente albumina. Foram observadas pequenas diferenças entre os grupos; portanto, uma análise exploratória mais detalhada por PCA foi realizada para identificar alterações espectrais particulares associadas a diferenças na constituição molecular dos soros de indivíduos com COVID-19.

A tabela 3 apresenta os picos observados no estudo com suas atribuições bioquímicas referidas na literatura (Chen, 2021; Rumaling, 2022; Naz *et al.*, 2024).

Tabela 3 -Agrupamento bioquímico: posições dos picos das bandas dos espectros Raman, atribuição segundo a literatura para estudos COVID-19

Posição do pico (cm ⁻¹)	Atribuição em estudos de COVID-19	Referência*
810	Amidas, Proteínas, RNA	A
842	Aminoácidos, Prolina	A
1001	Proteínas	A
509	Glicoproteínas, Lipídios	B
577	Triptofano, Cisteína	B
656	Triptofano	B
716	Ácido nucleico	B
748	Triptofano	B
782	Ácido nucleico	B
846	Glicoproteína	B
951	Triptofano	B
983	Triptofano, Valina	B
1000	Fenilalanina	B
1060	Fosfolipídios	B
1207	Triptofano	B
1249	Amida III	B
1317	Aminoácidos	B
1384	Metila	B
1453	Glicoproteínas, Lipídios	B
1554	Triptofano	B
1048	Triptofano, Fenilalanina	B
1126	Triptofano, Fenilalanina	B
534	Éster de colesterol	C
591	Amida IV	C
723	Proteína de alongamento C-C	C
744	Modo de respiração anel timina DNA/RNA	C
835	Aminoácido tirosina	C
882	Residuo de triptofano e tirosina	C
927	Alongamento C-COO ⁻ fenilalanina	C
1481	Amida II	C
1541	Grupo carbonila amida	C

Fontes: (A) Chen, 2021; (B) Rumaling, 2022, (C) Naz *et al.*, 2024

4.1 Análise exploratória por PCA com análise discriminante e classificação

A análise exploratória por meio das características PCA, mostrou diferenças na composição bioquímica do grupo controle e COVID-19, evidenciado por picos Raman atribuídos a proteínas, aminoácidos, ácido nucleico e lipídios em ambos os experimentos (amostras submetidas a RT-PCR e Imunocromatografia).

A Figura 14 revela os seis primeiros escores loadings (PCs) utilizando soros provenientes do experimento Imunocromatografia. Eles representam 98,9% da variação espectral, sendo que o score 1 representa sozinho 98,3% da variação. A diferença de 0,6%, embora em pequena concentração no soro, revela as diferenças entre os indivíduos negativos e positivos para COVID-19 sugerindo a natureza complexa da resposta do organismo após a infecção viral.

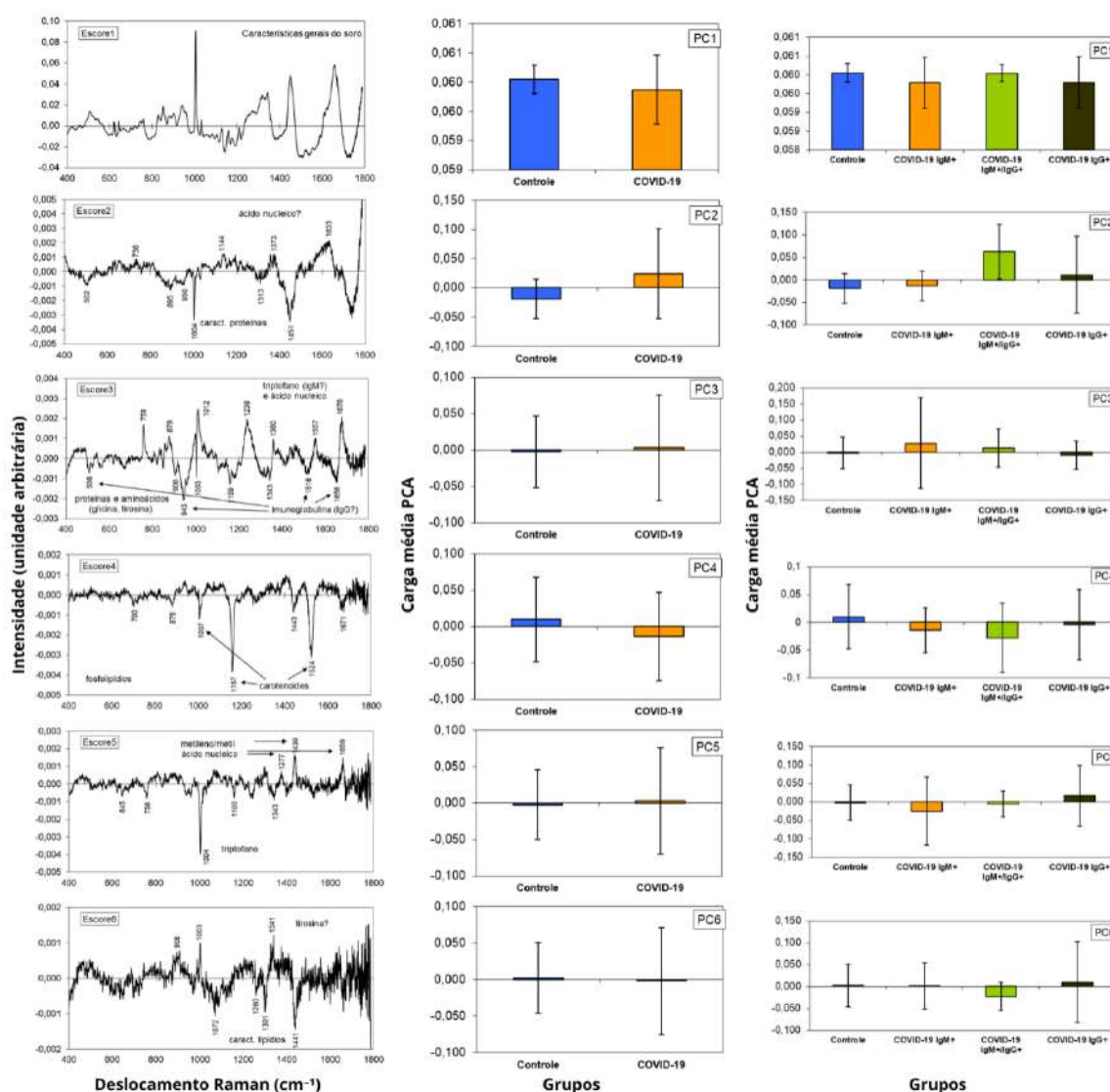


Figura 14: Gráfico dos seis componentes principais escores e Loadings (PCs) para o experimento provenientes das amostras de imunocromatografia.

A Figura 15 representa os seis primeiros escores e loadings (PCs) das amostras de soro provenientes do experimento RT-PCR. Eles perfazem 99,4% da variação espectral. A significância estatística de cada PC no grupo COVID-19 versus Controle pode ser visualizada na Figura.

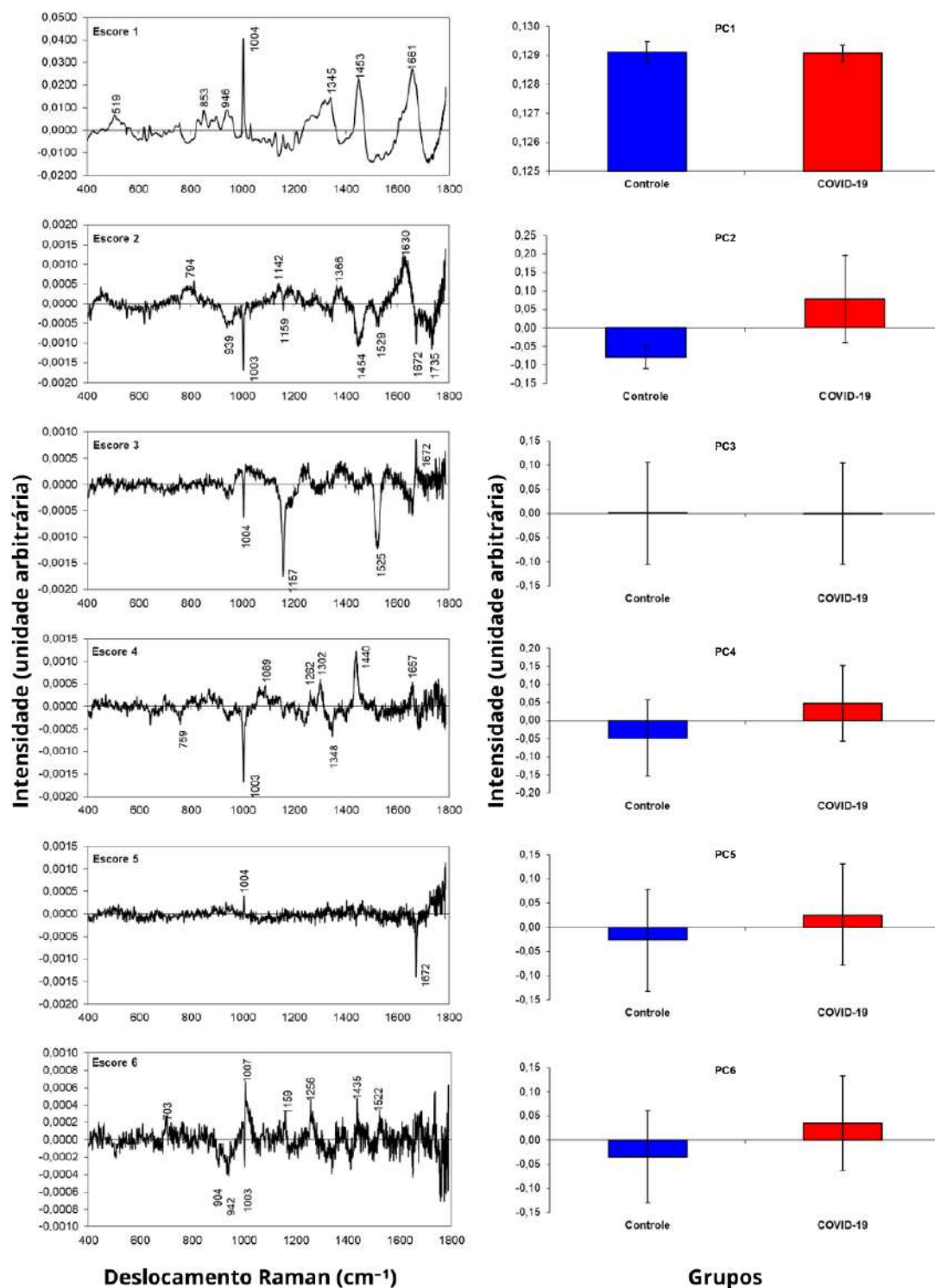


Figura 15: Gráfico dos primeiros seis componentes principais e escores e suas atribuições bioquímicas para o experimento proveniente de amostras de RT-PCR.

4.2 Análise discriminante e classificação RT-PCR e Imunocromatografia

A partir dos espectros Raman dos soros e dos seis primeiros PCs de ambos os grupos (analisados separadamente) foi desenvolvido um modelo de classificação usando a análise discriminante por meio do software Chemoface. Os modelos empregaram análise discriminante (PCA-DA) e análise discriminante PLS (PLS-DA) aplicadas ao espectro. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos em sensibilidade, especificidade e acurácia para os estudos de RT-PCR e Imunocromatografia.

Tabela 4 - Métricas de desempenho da espectroscopia Raman

Teste de COVID-19	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
	%	%	%
RT-PCR	80	100	90,0
Imunocromatografia	84	95	90,3

4.2.1 Análise discriminante e classificação de todos os conjuntos de dados

Para esse estudo, foram usados todos os espectros separados em grupos negativos e positivos com a finalidade de estabelecer um modelo de validação do grupo COVID-PCR e COVID imunocromatografia utilizando a técnica de validação cruzada *leave-one-out*. Nessa técnica um conjunto de dados é usado uma vez como teste, enquanto o restante dos dados é usado para treinamento do modelo.

Essa ferramenta permite o aproveitamento máximo dos dados, facilitando a análise em conjunto de dados pequenos e resultando em estimativas de desempenho mais precisas. A Figura 16 representa a média desses espectros enquanto a Figura 17 evidencia os espectros e os componentes principais. Na Figura 18 é possível comparar os componentes principais de todos os experimentos separadamente.

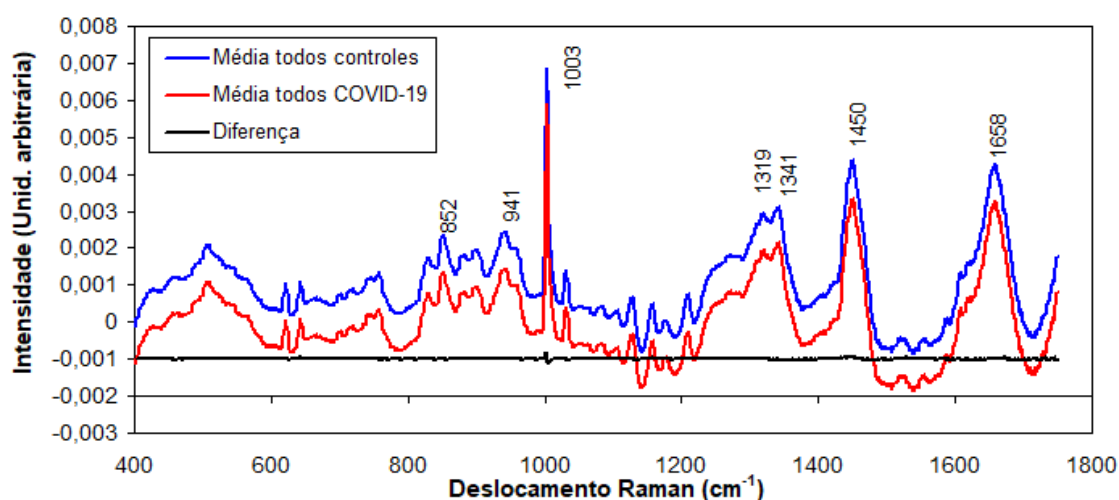


Figura 16: Espectros obtidos pela média de todos os indivíduos negativos e positivos para COVID-19 obtidos dos experimentos RT-PCR e Imunocromatografia.

Na Figura 17 indica o experimento utilizando o conjunto de amostras controle e COVID-19, nela é possível verificar os deslocamentos bem como as cargas de componente principal separadas por sequência de aparição.

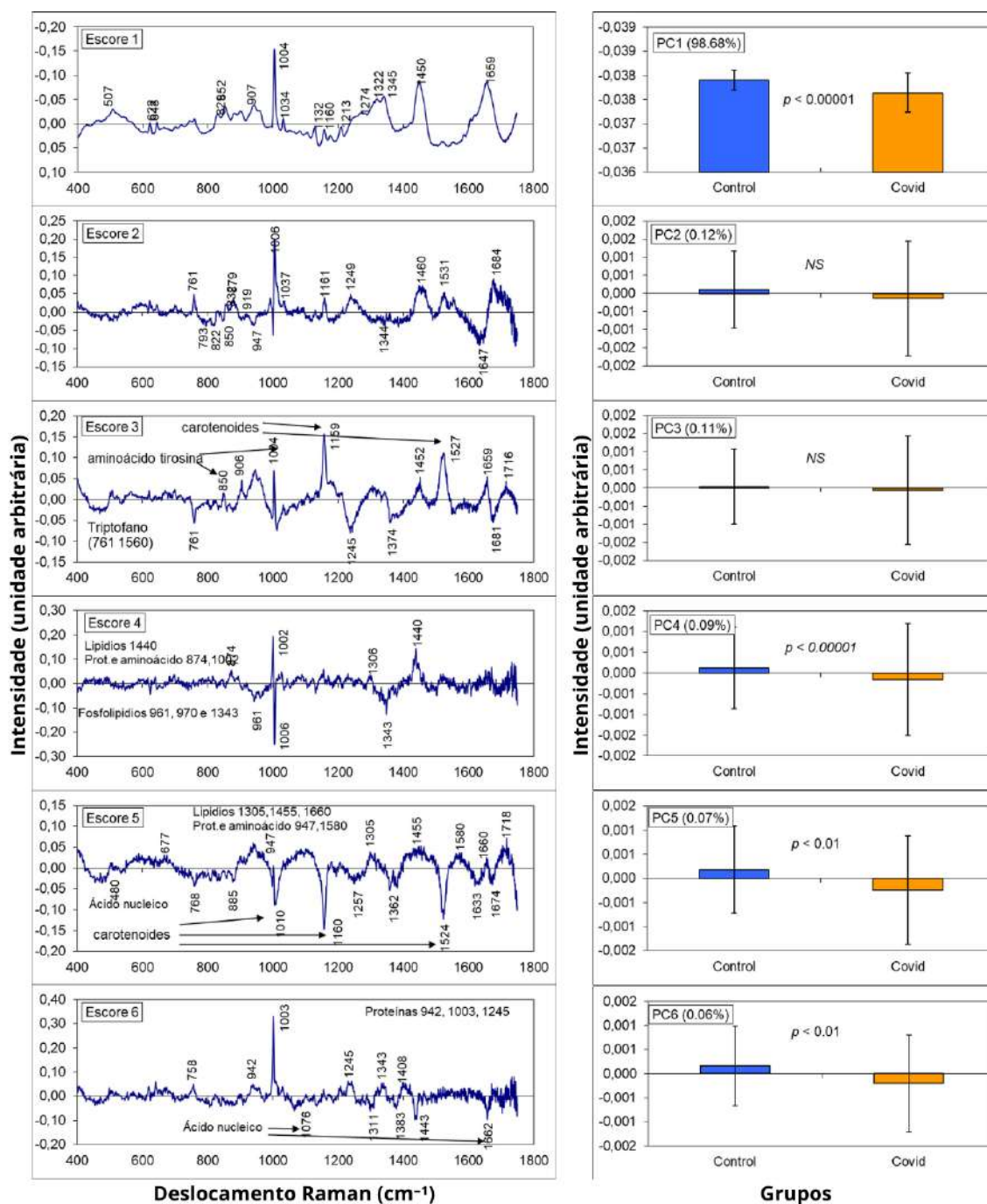


Figura 17: Espectros médios e PCs provenientes da união de todos os espectros obtidos nos experimentos RT-PCR e Imunocromatografia

A figura 18 demonstra o comparativo entre os gráficos das cargas de componente principal entre os três experimentos

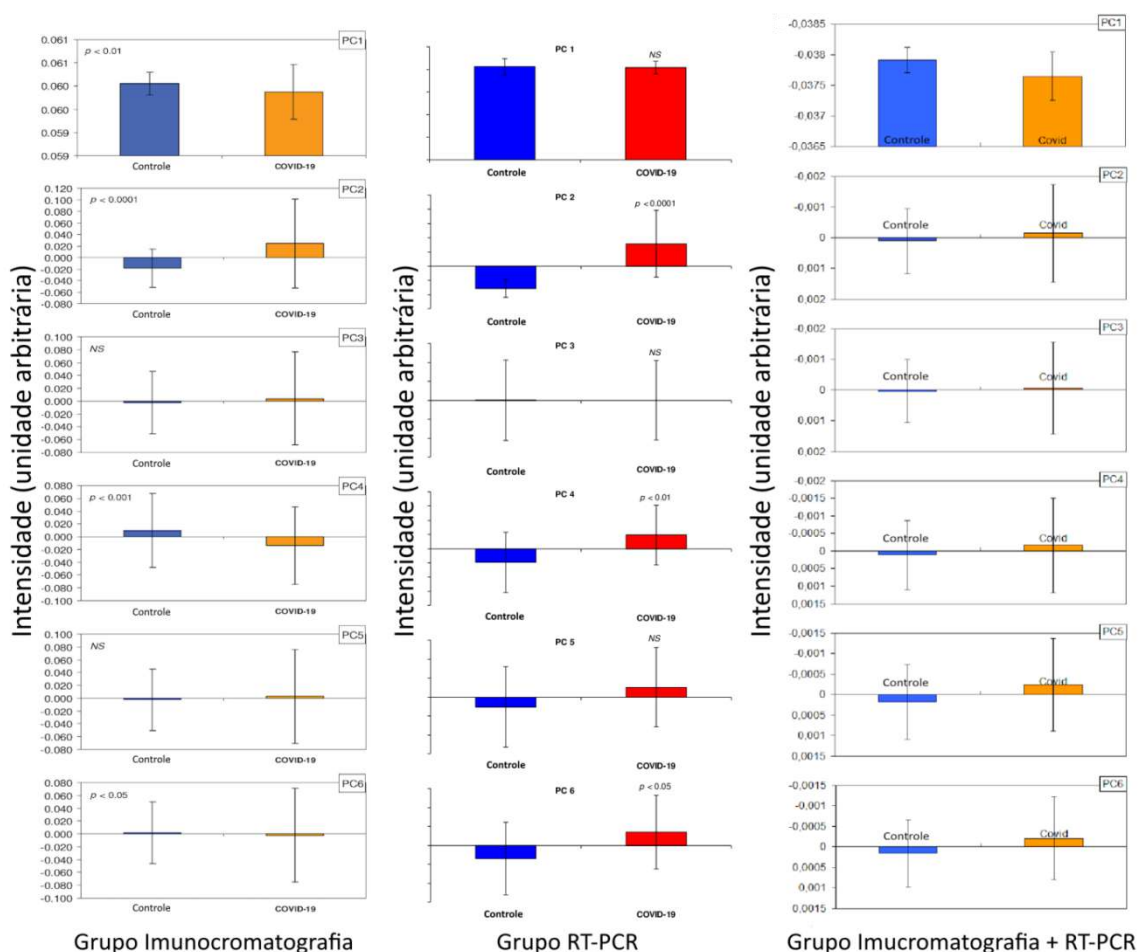


Figura 18: Comparativo entre os Componentes principais do experimento RT-PCR, Imunocromatografia e do conjunto de dados RT-PCR e Imunocromatografia

A partir da média dos espectros Raman dos soros e dos seis primeiros PCs de ambos os grupos, foi desenvolvido um modelo de classificação análise discriminante no software Chemoface. Os modelos empregaram análise discriminante (PCA-DA) e análise discriminante PLS (PLS-DA) aplicadas ao espectro. A Tabela 5 apresenta o número de amostras e erros obtidos por espectroscopia Raman, enquanto a tabela 6 apresenta a matriz de contingência para a obtenção de sensibilidade e especificidade e finalmente a tabela 7 apresenta os resultados obtidos em sensibilidade, especificidade e acurácia para ambos os estudos usando a média do grupo controle (negativo para COVID-19) e positivo para COVID-19.

Tabela 5: Matriz de contingência de erros para os modelos de classificação Raman utilizando os espectros dos grupos

Grupo	Pacientes	Erros de diagnóstico Raman (por paciente)
Controle (RT-PCR)	10	1
Controle (Imunocromatografia)	54	3
COVID-19 (RT-PCR)	10	4
COVID-19 (Imunocromatografia)	40	4

Tabela 6: Matriz de contingência para cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia

Amostras	Diagnóstico Raman/ PLS –DA	
	COVID-19	Controle Negativo
Soro Controle ($n = 64$)	4	60
Soro COVID-19 ($n = 50$)	42	8

Tabela 7: Sensibilidade, Especificidade e Acurácia do conjunto de dados Controle e COVID-19 utilizando os experimentos RT-PCR e Imunocromatografia

Grupo	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
	%	%	%
RT-PCR e Imunocromatografia	84	93,8	89,5

5 DISCUSSÃO

O soro humano é composto por aproximadamente 91% de água, 8% de proteínas e 3% de eletrólitos, carboidratos, lipídios, produtos de excreção e outros metabólitos. As imunoglobulinas, que são proteínas envolvidas na resposta imune à infecções, são divididas em IgG que compõe cerca de 70 a 80% do total das imunoglobulinas, IgA abrange aproximadamente 10 a 15% e IgM corresponde a cerca de 5 a 10% sendo essa a primeira classe de anticorpos a ser produzida em resposta a um antígeno (Anderson, 2002).

A detecção dos anticorpos para a COVID-19 é especialmente indicada como complemento da RT-PCR, quando há sintomatologia e o exame indica negatividade, além disso é importante na pesquisa de infecção assintomática onde ocorreu contato com indivíduos positivos. Um estudo realizado em 164 indivíduos com contato próximo a portadores de COVID-19 e assintomáticos, demonstrou que 16 apresentavam o teste RT-PCR positivo e foram detectadas as imunoglobulinas IgG e IgM. Ademais, 7 indivíduos apresentaram IgG e/ou IgM positivos e RT-PCR negativos (Long Q *et al.*, 2020; Fleischmann, 2023).

Para ambos os experimentos (metodologia RT-PCR e imunocromatografia) o Escore 1 apresentou características espectrais relacionadas ao soro, porém no grupo experimental por imunocromatografia houve significância estatística $p < 0,01$ e uma diferença na concentração da proteína no grupo COVID-19 em relação ao controle, sugerindo diminuição de albumina. Quando separado por imunoglobulina essa queda estava relacionada ao subgrupo IgM e IgG. A diminuição de albumina pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade capilar onde a proteína migraria para o espaço extracelular ou efeitos de citocinas pró-inflamatórias (Rodriguez *et al.*, 2020, Thomset *et al.*, 2020).

O Escore 2 de ambos os grupos (RT-PCR e Imunocromatografia) apresentaram significância estatística, $p < 0,0001$ e características espectrais positivas que podem ser atribuídas aos ácidos nucleicos e proteínas. Foram observados picos nas posições 794, 1142, 1366 e 1630 cm^{-1} para as amostras provenientes do experimento RT-PCR indicando a presença de amins/amidas e ácido nucleico, enquanto nas amostras provenientes do experimento imunocromatografia foram identificados picos nas posições 736, 1144, 137 e 1633 cm^{-1} indicando a presença de ácido nucleico. A

identificação de ácido nucleico sugere a presença do vírus. Os picos de proteína de menor intensidade no grupo COVID, foram observados para o grupo RT-PCR nas posições 939, 1003, 1454 e 1672 cm^{-1} e para o grupo imunocromatografia nas posições 502, 895, 950, 1004, 1313 e 1451 cm^{-1} . Essas menores intensidades nos picos de proteínas sugerem a fase exsudativa e diminuição geral da produção proteica que pode ser explicada pela presença da proteína Ndp1 codificada na presença do SARS-CoV-2, que se liga à subunidade ribossômica 40 S, impedindo sua ligação com o RNA mensageiro e afetando a produção normal de proteínas (Thomset *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2021). Ademais, no grupo RT-PCR observou-se concentração menor de carotenoide em relação ao controle identificados por meio dos picos 1159 e 1529 cm^{-1} , portanto, as diferenças encontradas entre os dois experimentos no Escore 2 foi a presença de amins/amidas (maiores quando comparadas ao controle) e carotenoide (menores quando comparados ao controle) no grupo RT-PCR. A COVID-19 aumenta os mediadores químicos da inflamação, como amins vasoativas (histamina), derivadas de grânulos que estão dentro das células, como macrófagos teciduais, células endoteliais e leucócitos (Ettah; Ashton, 2018; Houet *et al.*, 2020). Esses mediadores químicos incluem amins vasoativas (histamina), serotonina. O aumento de amins observado nos espectros Raman também pode ser explicado pelo aumento das transaminases (TGO e TGP), que são enzimas responsáveis por transferir um grupo amina de um aminoácido para um hidrocarboneto para formar um aminoácido diferente e pelo aumento da ureia (principal composto funcional das amidas) e da amina nitrogenada creatina sintetizada no fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina e arginina, tendo também a metionina como doador de metil (Khan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Mahmood *et al.*, 2018). Portanto, essas amins poderiam ser responsáveis pelas características Raman referidas às amins/amidas que estavam presentes nos soros do grupo positivo para COVID-19 pela técnica RT-PCR. A ausência desses picos no grupo de imunocromatografia pode ser explicada pelas características da população que apresentava-se assintomática (menor gravidade) nesses grupos.

O Escore 3 não apresentou diferença estatística tanto para o experimento usando amostras testadas por RT-PCR quanto para o experimento usando Imunocromatografia, apesar de apresentar picos negativos sugestivos de caroteno para as amostras provenientes do experimento RT-PCR, em 1004, 1157, e 1525 cm^{-1} . Para o experimento de imunocromatografia foram observados picos positivos sugestivos de

ácido nucleico e triptofano (759, 1012, 1360, 1676, 879, 1238 e 1557 cm^{-1}) e picos negativos sugestivo de proteína e aminoácidos (glicina e tirosina) nas faixas de 906, 1003, 1159 e 1343 cm^{-1} , além disso foram observados picos sugestivos de imunoglobulina nas posições 508, 943, 1518 e 1656 cm^{-1} . A presença de ácido nucleico sugere que o material genético do vírus está presente na fase aguda da infecção para COVID-19 e podem ser detectáveis. Ademais, os aminoácidos glicina e tirosina podem estar em menor intensidade no grupo IgM do que nos outros grupos. A glicina pode estar reduzida em processos inflamatórios, e a imunoglobulina contém resíduos de triptofano, um aminoácido essencial capaz de produzir compostos bioativos proporcionando uma resposta anti-inflamatória, onde promove a atração de macrófagos além de promover respostas neurológicas e imunes entre outros mecanismos, podendo regredir a doença (Hartoget *et al.*, 2013; Cervenkaet *et al.*, 2017). Além disso, pode ocorrer uma desregulação no metabolismo do nitrogênio devido à infecção viral, com consequente alteração na produção de aminoácidos (Cervenkaet *et al.*, 2017, Thomas *et al.*, 2020). A presença da proteína imunoglobulina é corroborado com os achados em pacientes portadores do vírus da dengue, onde foram observados picos Raman associados a imunoglobulinas, difosfato de adenosina e hemoglobina (Khan *et al.*, 2016; Mahmoodet *et al.*, 2018).

O Escore 4 apresentou significância estatísticas para os dois grupos de experimento, sendo que no RT-PCR $p < 0,01$ e para imunocromatografia $p < 0,001$. Foram observadas características espectrais negativas associadas a lipídios, incluindo fosfolipídios para ambos os grupos, identificados pelos picos 1089, 1262, 1302, 1440, 1657 cm^{-1} para as amostras do experimento RT-PCR e 700, 879, 1443 e 1671 cm^{-1} no grupo Imunocromatografia. Os mecanismos associados às características lipídicas podem ser o aumento do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, proteína C reativa associados à resposta inflamatória para os grupos com COVID-19, particularmente quando a infecção está em estágio de transição (IgM+/IgG+) (Thomas *et al.*, 2020). A presença dos picos de carotenoides observados com mais intensidade no estágio intermediário da infecção por COVID-19, nos espectros das amostras diagnosticadas por imunocromatografia, não foi encontrada no grupo RT-PCR, sugerindo que a presença de carotenoides pode ser uma importante característica de discriminação da COVID-19. O estudo de Khan *et al.* mostrou que pacientes com vírus da dengue apresentaram uma diminuição nos picos referidos aos carotenoides em comparação aos não infectados (Khan *et al.*, 2016).

O Escore 5 não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos, em ambos os experimentos (RT-PCR e Imunocromatografia). No estudo RT-PCR houve pico relacionado a ureia e possível artefato de raio cósmico enquanto no estudo envolvendo as imunoglobulinas apareceram picos positivos referentes ao metileno/metil em 1439 cm^{-1} e ácido nucléicos 1377 e 1659 cm^{-1} e picos negativos relacionados a triptofano observados nas posições 645 , 758 , 1004 , 1160 e 1343 cm^{-1} . As características metileno/metil (não significativamente maiores para o IgG+) podem estar associadas aos modos CH dos carboidratos nas imunoglobulinas classe IgG. Embora não significativo ocorre a presença de ácido nucleico refletido apenas no grupo IgG, sugerindo a ocorrência de alta carga viral mesmo no estágio tardio da infecção em pacientes assintomáticos (Houet *al.*, 2020).

O Escore 6 apresentou significância estatística para RT-PCR e Imunocromatografia com $p < 0,05$ em ambos os grupos. No experimento de RT-PCR foram reveladas características espectrais negativas que sugerem proteínas e aminoácidos constatadas pelos picos 904 , 942 , 1003 cm^{-1} maiores para o grupo controle (ou seja menores no grupo COVID-19. No grupo RT-PCR foram observadas características espectrais positivas que podem ser atribuídas a compostos de enxofre 703 cm^{-1} , aminas/ácido nucleico 1256 e 1435 cm^{-1} e carotenoides 1007 , 1159 e 1522 cm^{-1} , todos sugestivos de serem remanescentes e maiores para o grupo COVID-19, portanto o controle apresentou maiores quantidades de aminoácidos e proteínas, enquanto o grupo COVID-19 maiores quantidades de lipídios, enxofre e carotenoides (Cervenkaet *al.*, 2017; Fanet *al.*, 2010; Thomset *al.*, 2020; Hartoget *al.*, 2013). Esses achados podem ser relacionados ao processo viral, onde ocorre aumento de lipídios circulantes no sangue (metabólitos lipídicos associados ao processo inflamatório) e queda de aminoácidos, especialmente a tirosina, devido à ação viral.

Esta análise exploratória evidenciou que a COVID-19 alterou o perfil espectral Raman do soro e as alterações bioquímicas dependem do estado da infecção. O SARS-CoV-2 ao infectar o organismo ativa a resposta humoral gerando anticorpos sugerindo que a composição bioquímica se modifica e podem ser detectados mesmo em pacientes assintomáticos os quais representam aproximadamente 20% de todos os casos de COVID-19 (Yin *et al.*, 2021).

Em ambos os experimentos (RT-PCR e Imunocromatografia) foram observados aumento de lipídios (incluindo fosfolipídios) e presença de ácido nucleico, diminuição de proteínas e aminoácidos. A diminuição do aminoácido tirosina foi observada em um experimento utilizando saliva com a metodologia *Surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS) e foi relacionado com alguma interação específica entre resíduos desse aminoácido com as proteínas virais e outras moléculas como o receptor de acetilcolina e imunoglobulinas como IgA, IgG e IgM (Beruset *al.*, 2023; Smith, Dent, 2004).

No experimento usando RT-PCR foram observados dados espectrais sugestivos de amina/amida, ureia e compostos sulfurosos, esses elementos não foram observados no experimento usando imunocromatografia. As amidas são estruturas que compõem o organismo para a construção de peptídeos, proteínas e ácido nucleico, esses marcadores foram observados em um estudo comparando diferentes períodos da infecção da COVID-19 e após a cura. Nesse mesmo estudo foi observada a alteração de albumina ao longo do tempo (Gulekenet *al.*, 2022). Ademais, outros elementos foram observados nas amostras envolvendo a imunocromatografia, como a presença de picos relacionados ao metileno/metil, sendo que, os mesmos foram encontrados em um estudo relacionado a saliva com a metodologia SERS, esse achado pode ser relacionado a presença de proteínas virais que funciona como um doador de metil no processo da replicação viral, ademais durante a infecção as células T e os macrófagos são ativados resultando em aumento de citocinas, sendo que as células T tem necessidade aumentada de metionina (Beruset *al.*, 2023).

Uma diferença que ocorreu entre os dois experimentos foi a presença de carotenoide, identificado apenas no grupo COVID-19 imunocromatografia (escore 4) enquanto para o grupo RT-PCR, esse elemento foi encontrado apenas no escore 6 de maneira remanescente para COVID-19. Os carotenoides são compostos lipossolúveis encontrados nas células linfóides citotóxicas, exterminadoras naturais e complexo de Golgi que são estruturas capazes de aumentar a população de linfócitos, ademais possuem papel antioxidantes devido a sua propriedade de eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS). A diminuição desse elemento causa um desbalanço no sistema de reação de oxidação/redução (REDOX) e aumento no estresse oxidativo, portanto a presença desse elemento indica um marcador de benefício para o indivíduo (Thomset *al.*, 2020;

Hartoget *al.*, 2013; Cervenkaet *al.*; 2017; Zhang *et al.*, 2020; Thomas *et al.*,2020; Houet *al.*, 2020; Khristoforova; Bratchenko, 2023).

Assim, é evidente que as características espectrais Raman observadas pela PCA mostraram alterações na bioquímica do soro em decorrência do material genético e anticorpos em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2, sendo as pequenas diferenças nos espectros suficientes para distinguir o diagnóstico (Yinet *al.*, 2021; Zhouet *al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

A espectroscopia Raman foi aplicada às amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de COVID-19 para obtenção dos seus espectros, os quais tiveram seus principais picos correlacionados aos componentes bioquímicos (proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídios).

Na análise exploratória por PCA dos espectros do sangue total, aplicou-se o teste *t* de Student que identificou os componentes principais 1, 2, 4 e 6 com diferenças estatisticamente significativas: Escore 1 imunocromatografia ($p < 0,01$), Escore 2 ambos os grupos ($p < 0,0001$), Escore 4 (RT-PCR $p < 0,01$) e Imunocromatografia ($p < 0,001$), Escore 6 ambos os grupos ($p < 0,05$) em picos atribuídos a ácido nucleico, lipídios incluindo fosfolípides, carotenoides, aminas/amidas e compostos sulfurosos, que se mostraram com maior intensidade no grupo COVID-19, enquanto no grupo controle, os picos mais relevantes foram para proteína no Escore 2 (ambos soros dos experimentos RT-PCR e imunocromatografia), tirosina no Escore 6 para amostras provenientes de imunocromatografia e Escore 4 para amostras provenientes do RT-PCR. No Escore 4 do experimento envolvendo amostras RT-PCR foram observados aminoácidos sugestivos de triptofano e fenilalanina, enquanto no Escore 6 foram visualizados picos de proteínas e aminoácidos.

No modelo de classificação utilizando PLS aplicado aos soros provenientes do RT-PCR a sensibilidade foi de 80%, especificidade de 100% e acurácia global de 90%, sendo que para a técnica padrão do RT-PCR o valor de sensibilidade é maior que 95% e especificidade 100%, enquanto nos soros provenientes de imunocromatografia os resultados de sensibilidade foi de 84%, especificidade 95% e acurácia 90,3% e os valores obtidos no método de imunocromatografia são sensibilidade 96,8%, especificidade 99,4% e acurácia 98,4%.

No modelo de classificação utilizando todos os grupos foi observada sensibilidade de 84%, especificidade de 93,8% e acurácia de 89,5%. Trabalhos futuros serão importantes para a realização de um modelo de predição para amostras desconhecidas.

A espectroscopia Raman mostrou ter potencial como ferramenta diagnóstica para a COVID-19 por meio da detecção de suas alterações bioquímicas as quais apresentaram padrão espectral diferente dos indivíduos negativos. Ademais, o modelo estatístico proposto para a validação dos resultados, apresentou alta sensibilidade, especificidade e acurácia podendo ser utilizado em estudos futuros como preditor de resultados para amostras desconhecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALWINE, J. C. *et al.* A critical analysis of the evidence for the SARS-CoV-2 origin hypotheses. **Journal of Virology**, v. 97, n. 4, 2023.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome. **Molecular and cellular proteomics: history, character and diagnostic prospect**. *Molecular & cellular Proteomics*, v. 1, n. 11, p. 845–867, nov. 2002. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12488461/> acesso em 02 de março de 2025.

ANWAR, S. *et al.* Gold nanocubes based optical detection of HIV-1 DNA via surface enhanced Raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 226, n. 115242, p. 115242, 2023.

ATTIA, Y. A. *et al.* COVID-19: pathogenesis, advances in treatment and vaccine development and environmental impact—an updated review. **Environmental science and pollution research international**, v. 28, n. 18, p. 22241–22264, 2021.

AUWAERTER, P. G. Coronavírus COVID-19 (SARS-CoV-2). Disponível em <<https://www.landmarkaesthetics.net/wp-content/uploads/2020/04/Coronavirus-COVID-1.pdf>>. Acesso em: 03 de março de 2025

BARBERIA, L. G. *et al.*, An assessment of the public health surveillance strategy based on molecular testing during three major pandemic waves of COVID-19 in Brazil. **PLOS global public health**, v. 3, n. 8, p. e0002164, 2023.

BASTOS ML, TAVAZIVA G, ABIDI S *et al* (2020) **Diagnostic accuracy of serological test for COVID 19 systematic review and metaanalysis**. *Br Med J* 370:m2516. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2655>

BERUS, S. M. *et al.* SERS signature of SARS-CoV-2 in saliva and nasopharyngeal swabs: Towards perspective COVID-19 point-of-care diagnostics. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 11, p. 9706, 2023.

BOSCHIERO, M. N. *et al.* One year of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Brazil: A political and social overview. **Annals of global health**, v. 87, n. 1, p. 44, 2021.

BUTLER, H. J. *et al.* Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature protocols**, v. 11, n. 4, p. 664–687, 2016.

CARLOMAGNO, C. *et al.* COVID-19 salivary Raman fingerprint: innovative approach for the detection of current and past SARS-CoV-2 infections. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021.

CERVENKA, I.; AGUDELO, L. Z.; RUAS, J. L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. **Science (New York, N.Y.)**, v. 357, n. 6349, 2017.

CHATTERJEE, S. K.; SAHA, S.; MUNOZ, M. N. M. Molecular pathogenesis, immunopathogenesis and novel therapeutic strategy against COVID-19. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 196, 2020.

CHEN, D. Analysis of machine learning methods for COVID-19 detection using serum Raman spectroscopy. **Applied artificial intelligence: AAI**, v. 35, n. 14, p. 1147–1168, 2021.

COVID - 19 - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/ial/centros-tecnicos/centro-de-virologia/destaques-direita/covid-19>>. Acesso em: 21 nov. 2024. Protocolo inicial da COVID-19 2021

DELRUE, C.; SPEECKAERT, M. M. The potential application of Raman spectroscopy in kidney diseases. **Journal of personalized medicine**, v. 12, n. 10, 2022.

DEMOLIOU, C.; PAPANEOPHYTOU, C.; NICOLAIDOU, V. SARS-CoV-2 and HIV-1: So Different yet so Alike. Immune Response at the Cellular and Molecular Level. **International journal of medical sciences**, v. 19, n. 12, p. 1787–1795, 2022.

DUONG, Y. T.; WRIGHT, C. G.; JUSTMAN, J. Antibody testing for coronavirus disease 2019: not ready for prime time. **BMJ (Clinical research ed.)**, p. m2655, 2020.

EJAZI, S. A.; GHOSH, S.; ALI, N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: a nearly overview. **Immunology and cell biology**, v. 99, n. 1, p. 21–33, 2021.

ETTAH, I.; ASHTON, L. Engaging with Raman spectroscopy to investigate antibody aggregation. **Antibodies (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 3, p. 24, 2018.

EVERTON, E. *et al.* Biochemical Analysis of Urine Samples from Diabetic and Hypertensive Patients without Renal Dysfunction Using Spectrophotometry and Raman Spectroscopy Techniques Aiming Classification and Diagnosis. **Bioengineering**, v. 9, n. 10, p. 500–500, 24 set. 2022.

FAN, C. *et al.* Detecting food- and waterborne viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Journal of food science**, v. 75, n. 5, 2010.

FARIA, D. L. A. DE; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Química nova**, v. 20, n. 3, p. 319–323, 1997.

FLEISCHMANN, C. J. *et al.*. Detection of IgM, IgG, IgA and neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 infection and mRNA vaccination. **Journal of medical microbiology**, v. 72, n. 1, 2023.

FORATTINI, O. P. AIDS e sua origem. **Revista de saúde pública**, v. 27, n. 3, p. 153–156, 1993.

SALA 2011 **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho – 2ª edição**. Disponível em: <<https://editoraunesp.com.br/catalogo/9788571398689,fundamentos-da-espectroscopia-raman-e-no-infravermelho-2-edicao>>. Acesso em: 21 nov. 2024.

GIANSANTE, S. *et al.* Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers in medical science**, v. 37, n. 1, p. 287–298, 2022.

GOTTLIEB, M. S. Pneumocystis pneumonia—Los Angeles. **American journal of public health**, v. 96, n. 6, p. 980–981, 2006.

GOULART, A. C. C. *et al.* Diagnosing COVID-19 in human serum using Raman spectroscopy. **Lasers in medical science**, v. 37, n. 4, p. 2217–2226, 2022.

GOULART, A. C. C. *et al.* Diagnosing COVID-19 in nasopharyngeal secretion through Raman spectroscopy: a feasibility study. **Lasers in medical science**, v. 38, n. 1, 2023.

GULEKEN, Z. *et al.* Development of novel spectroscopic and machine learning methods for the measurement of periodic changes in COVID-19 antibody level. **Measurement: journal of the International Measurement Confederation**, v. 196, n. 111258, p. 111258, 2022.

GUO, Y.-R. *et al.*. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military medical research**, v. 7, n. 1, 2020.

HALL, P.; MÜLLER, H.-G.; WANG, J.-L. Properties of principal component methods for functional and longitudinal data analysis. **Annals of statistics**, v. 34, n. 3, 2006.

HANLEY, B. *et al.*, Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. **The Lancet. Microbe**, v. 1, n. 6, p. e245–e253, 2020.

HANLON, E. B. *et al.*. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Physics in medicine and biology**, v. 45, n. 2, p. R1–R59, 2000.

HARTOG, A. *et al.*. Collagen hydrolysate inhibits zymosan-induced inflammation. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 238, n. 7, p. 798–802, 2013.

Organização Mundial da Saúde (OMS) **HIV and AIDS**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>>. Acesso em: 21 nov. 2024.

HOU, H. *et al.*. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. **Clinical and translational immunology**, v. 9, n. 5,

IBM SPSS Statistics 30.0.0. Disponível em: <<https://www.ibm.com/docs/en/spss-statistics/30.0.0?topic=features-partial-least-squares-regression>>. Acesso em 3/3/2025

KELLAM, P.; BARCLAY, W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. **The Journal of general virology**, v. 101, n. 8, p. 791–797, 2020.

KHAN, S. *et al.* Raman spectroscopic analysis of dengue virus infection in human blood sera. **Optik**, v. 127, n. 4, p. 2086–2088, 2016.

KHRISTOFOROVA, Y.; BRATCHENKO, L.; BRATCHENKO, I. Raman-based techniques in medical applications for diagnostic asks: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 21, p. 15605, 2023.

KRAFFT, C.; POPP, J. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 3, p. 699–717, 2015.

KUHAR, N. *et al.* Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. **RSC advances**, v. 8, n. 46, p. 25888–25908, 2018.

LAI, C.-C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 3, p. 105924, 2020.

LE, K. *et al.* Structural understanding of SARS-CoV-2 virus entry to host cells. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 10, 2023.

LI, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 424–432, 2020.

LI, G. *et al.* Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 22, n. 6, p. 449–475, 2023.

LI, Z. *et al.* Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, 27 fev. 2020.

LIMA, L. N. G. C.; SOUSA, M. S.; LIMA, K. V. B. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal of Health e Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2020.

LONG, C. *et al.* Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? **European journal of radiology**, v. 126, n. 108961, p. 108961, 2020a.

LONG, Q.-X. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 845–848, 2020b.

LU, R. *et al.* Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

LUKOSE, J. *et al.* Raman spectroscopy for viral diagnostics. **Biophysical reviews**, v. 15, n. 2, p. 199–221, 2023.

MAHMOOD, T. *et al.* Raman spectral analysis for rapid screening of dengue infection. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 200, p. 136–142, 2018.

MELITTO, A. S. *et al.* Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 54, n. 8, p. 1143–1156, 5 jul. 2022.

MOUSAVIZADEH, L.; GHASEMI, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. **Wei mian yu gan ran zhi** [**Journal of microbiology, immunology, and infection**], v. 54, n. 2, p. 159–163, 2021.

NAZ, M. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) using blood serum samples. **RSC advances**, v. 14, n. 40, p. 29151–29159, Spring 2024.

NICOLA, M. *et al.* The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. **International journal of surgery (London, England)**, v. 78, p. 185–193, 2020.

NUNES, C. A. *et al.* Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003–2010, 2012.

ORLANDO, A. *et al.* A comprehensive review on Raman spectroscopy applications. **Chemosensors (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 9, p. 262, 2021.

PARASKEVAIDI, M. *et al.* Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy in the field of cancer and infectious diseases. **Applied spectroscopy reviews**, v. 56, n. 8–10, p. 804–868, 2021.

PAVELKA, V.; HEMZAL, D.; HRBÁČ, J. Complex evaluation of Raman spectra using morphological filtering: Algorithms, software implementation, and experimental verification of baseline correction, peak recognition, and cosmic ray removal in SERS spectra of designer drugs. **Journal of Raman spectroscopy: JRS**, v. 53, n. 12, p. 2100–2109, 2022.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe cuterespiratorysyndrome. **Nature medicine**, v. 10, n. S12, p. S88–S97, 2004.

PEZZOTTI, G. Raman spectroscopy in cell biology and microbiology. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 52, n. 12, p. 2348–2443, 22 ago. 2021.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, presentand future. **Nature medicine**, v. 11, n. S4, p. S5–S11, 2005.

QI, Y. *et al.* Recentprogresses in machine learning assisted Raman spectroscopy. **Advancedopticalmaterials**, v. 11, n. 14, 2023.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new typeofsecondaryradiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501–502, 1928.

RAMOJI, A. *et al.* Understandingvirusesand viral infectionsbybiophotonicmethods. **Translationalbiophotonics**, v. 4, n. 1–2, 2022.

RAYEGAN, S. *et al.*. A review on indoor airborne transmission of COVID-19–modellingandmitigation approaches. **Journalof building engineering**, v. 64, n. 105599, p. 105599, 2023.

RODRIGUEZ, L.; ZHANG, Z.; WANG, D. Recentadvancesof Raman spectroscopy for theanalysisofbacteria. **Analyticalscienceadvances**, v. 4, n. 3–4, p. 81–95, 2023.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. *et al.*. Clinical, laboratoryandimaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel medicine andinfectiousdisease**, v. 34, n. 101623, p. 101623, 2020.

RUMALING, M. I. *et al.*. Methods of optical spectroscopy in detection of virus in infected samples: A review. **Heliyon**, v. 8, n. 9, p. e10472, 2022.

RUMALING, M. I. *et al.*. Biofingerprint detection of corona virus using Raman spectroscopy: a novel approach. **SN applied sciences**, v. 5, n. 7, 2023.

RYABCHYKOV, O.; GUO, S.; BOCKLITZ, T. Analyzing Raman spectroscopic data. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 2, 2019.

SANTOS, A. *et al.*. Aplicação da espectroscopia raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Química nova**, 2019.

SHRESTHA, N. *et al.*. The impact of COVID-19 on globalization. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, v. 11, n. 100180, p. 100180, 2020.

SINKOVICS, J.; HORVATH, J.; HORAK, A. The origin and evolution of viruses (a review). **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 45, n. 3–4, p. 349–390, 1998.

SIRAJ, N. *et al.*. Raman spectroscopy and multivariate regression analysis in biomedical research, medical diagnosis, and clinical analysis. **Applied spectroscopy reviews**, v. 56, n. 8–10, p. 615–672, 2021.

SILVA, A. *et al.* SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros. [s.d.]. Tópicos em Virologia [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 2023, pp. 29-45. BIO collection. ISBN: 978-65-5708-151-8. <https://doi.org/10.7476/9786557082119.0003>.

SMITH, DENT Surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering. **Modern Raman Spectroscopy – A Practical 2004 Approach** Wiley, 17 Dec. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/0470011831.ch5>>

THOMAS, T. *et al.* COVID-19 infection alerts kidney urenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. **JCI insight**, v. 5, n. 14, 2020.

THOMS, M. *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6508, p. 1249–1255, 2020.

VASCONCELOS, Y. **O Brasil começa a testar**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/o-brasil-comeca-a-testar/>>. Acesso em: 3 mar. 2025.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics**. [s.l.] CRC Press, 2016.

VIEIRA, L. M. F.; EMERY, E.; ANDRIOLO, A. COVID-19 - Diagnóstico Laboratorial para Clínicos. 14 maio 2020. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/411/version/421> Acesso em 02 de março de 2025

WANG, S. *et al.* Fasting blood glucose at admission is an independent predictor for 28-day mortality in patients with COVID-19 without previous diagnosis of diabetes: a multi-centre retrospective study. **Diabetologia**, v. 63, n. 10, p. 2102–2111, 2020a.

WANG, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 2020b.

XAVIER, A. R. *et al.* COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, 2020.

XU, S. *et al.* Systematic optimization of universal real-time hypersensitive fast detection method for HBsAg in serum based on SERS. **Analytical chemistry**, v. 96, n. 17, p. 6784–6793, 2024.

YIN, G. *et al.* An efficient primary screening of COVID-19 by serum Raman spectroscopy. **Journal of Raman spectroscopy: JRS**, v. 52, n. 5, p. 949–958, 2021.

ZAPATERO GAVIRIA, A.; BARBA MARTIN, R. ¿Qué sabemos del origen del COVID-19 tres años después? **Revista clínica española**, v. 223, n. 4, p. 240–243, 2023.

ZHANG, K. *et al.* Nsp1 protein of SARS-CoV-2 disrupts the mRNA export machinery to inhibit host gene expression. **Science advances**, v. 7, n. 6, 2021.

ZHANG, Z. *et al.* Rapid detection of the Monkeypox virus genome and antigen proteins based on surface-enhanced Raman spectroscopy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 15, n. 29, p. 34419–34426, 2023.

ZHOU, L. *et al.* The label-free detection and identification of SARS-CoV-2 using surface-enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis. **Biosensors**, v. 13, n. 12, p. 1014, 2023.

Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças.

Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2018/manual_tecnico_hiv_27_11_2018_web.pdf/@@download/file>. Acesso em: 21 nov. 2024a.

Disponível

em: <https://www.molecular.abbott/content/dam/add/molecular/products/infectious->

disease/realtime-sars-cov-2-assay/Abbott%20RealTime%20SARS-CoV-2%20Assay%20Package%20Insert.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2024b. Abbott.2020

Disponível

em:<https://www.sobed.org.br/fileadmin/user_upload/sobed/2020/04/09/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf__2_.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2024c. SBPC,2020

Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. V4.

Rio de Janeiro: 2009.p.125-220 Fiocruz, 2009, p.126. Disponível em:

<<https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap2.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2024d

O vírus da Aids, 20 anos depois. Disponível

em:<<https://www.ioc.fiocruz.br/aids20anos/linhadotempo.html>>. 1999 Acesso em: 23 nov. 20 Fiocruz,1999

Disponível em: <<https://indicadores.aids.gov.br/>> .2023 Acesso em: 23 nov. 2024d. Ministério da Saúde, 2023

Histórico da pandemia de COVID-19. Disponível em OMS

2020:<<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso em: 24 nov. 2024.

Coronavírus Brasil.Ministério da saúde 2024. Disponível em:

<<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 24 nov. 2024.

APÊNDICE

Apêndice A

25/07/24, 17:24

Plataforma Brasil

Portal do Governo Brasileiro



ANA CRISTINA CASTRO GOUART - Pesquisador (V4.0.3)

Categorias

Submissão: 17/11/2019

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS E BACTERIANAS POR ESPECTROSCÓPIA RAMAN
Pesquisador Responsável: ANA CRISTINA CASTRO GOUART
Área Temática:
Versão: 1
CAAP: 2691/418 A 2000/5492
Submetido em: 17/11/2019
Instituição Proponente: ISCP - SOCIEDADE EDUCACIONAL LTDA.
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Receção: INE_COMPROVANTE_RECEPCAO_1471215

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
 - Projeto Original (PO) - Versão 1
 - Documentos do Projeto
 - Strutura Proposta - Submissão 1
 - Comprovante de Receção - Submissão 1
 - Comprova - Submissão 1
 - Declaração de Instituição e Infraestrutura
 - Ficha de Risco - Submissão 1
 - Informações Básicas do Projeto - Subm
 - Orçamento - Submissão 1
 - Projeto Detalhado / Boas Práticas Investig
 - TGL - Termos de Assentamento / Justif
 - Aprovação 1 - Universidade Arhem
 - Projeto Completo

Nome do Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

LISTA DE AVALIAÇÕES DO PROJETO

Avaliação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
PO	ANA CRISTINA CASTRO GOUART	1	17/11/2019	13/02/2020	Aprovado	Não	P C E +

HISTÓRICO DE TRÂMITES

Avaliação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	13/02/2020 17:33:14	Parecer Técnico	1	Coordenador	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	PESQUISADOR	
PO	13/02/2020 17:36:42	Parecer do Colegiado	1	Coordenador	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	13/02/2020 17:36:12	Parecer do Colegiado	1	Coordenador	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	13/02/2020 17:27:43	Aprovação de	1	Coordenador	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	11/12/2019 17:14:02	Confirmação de	1	Coordenador	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	09/12/2019 14:46:21	Indicação de	1	Secretaria	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	08/12/2019 14:38:09	Aprovação do PP	1	Secretaria	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	
PO	10/11/2019 23:19:43	Submissão para	1	Pesquisador	PESQUISADOR	Universidade Arhem - Morumbi Instituto Superior de Comunicação Publicitária - ISCP / SP	



25/07/24, 17:24

Plataforma Brasil

LEGENDA:

(*) Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
L = Entenda de Centro Coordenador	Lp = Entenda de Centro Participante	Lc = Entenda de Centro Coparticipante
R = Notificação de Centro Coordenador	Rp = Notificação de Centro Participante	Rc = Notificação de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE

Ano de submissão do Projeto
Tipo de centro
Código do Centro que está analisando o projeto

Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação
Dígito verificador
Sequencial quando cabível possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)

Voltar

Suporte a sistemas: 136 - opção B
 e-mail: suporte.sistemas@datasus.gov.br
 Site: <http://datasus.saude.gov.br/leia-oi-nosso>