

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ALESSANDRA SILVÉRIO

**ESPECTROSCOPIA RAMAN NO DIAGNÓSTICO DE HIPERLIPIDEMIA EM
CÃES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

São José dos Campos, maio/2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ALESSANDRA SILVÉRIO

**ESPECTROSCOPIA RAMAN NO DIAGNÓSTICO DE HIPERLIPIDEMIA EM
CÃES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

Orientadora: Profa. Dra. Livia H. M. da Silva Melo

Coorientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, maio/2025

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ALESSANDRA SILVÉRIO

**ESPECTROSCOPIA RAMAN NO DIAGNÓSTICO DE HIPERLIPIDEMIA EM
CÃES**

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

Profa. Dra. Livia H. M. da Silva Melo
Orientadora
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Henrique Carvalho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Renato Zângaro (Coordenação)
Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, maio/2025

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

ALESSANDRA SILVÉRIO

Médica Veterinária, graduada em 2002; Fisioterapeuta, graduada em 2008; Especialista em medicina chinesa, 2006, com extensão em Beijing 2006 e 2007. Curso de Fitoterapia chinesa, 2013; Terapia Neural 2014; Professora do Inst. Idís Lamasson, EPMvet e Areã Vet Academy

Ficha Bibliográfica elaborada pela Biblioteca LIAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S592e Silvério, Alessandra

Espectroscopia Raman no diagnóstico de hiperlipidemia em
cães. / Alessandra Silvério - 2025

42 f.: 30 cm

Orientadora: Prof.^a Livia Helena M. da Silva Melo

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade
Anhembi Morumbi, São Paulo, 2025.

Bibliografia: f. 26 - 30

1. Espectroscopia Raman 2. Hiperlipidemia em cães Título

CDD 610 28

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais *Esmael Silvério* e *Maria Luzia Silvério*, *in memoriam*, mesmo estando em diferentes dimensões, tenham a certeza de que sigo honrando e respeitando todos os ensinamentos que vocês me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Livia H. M da Silva Mélo e ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr, por toda paciência e ensinamentos.

À minha colega Daniela Lopes pelo carinho e direcionamento profissional.

À minha amiga de longa data, Roberta de Carvalho por toda a orientação emocional e prática.

RESUMO

A hiperlipidemia primária em cães é uma condição frequentemente observada nas rotinas clínicas veterinárias, associada ao aumento das concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos, podendo causar complicações cardiovasculares e metabólicas. Diante disso, torna-se essencial desenvolver métodos diagnósticos mais eficientes e precisos para monitoramento clínico e prevenção. Este estudo teve como objetivo avaliar diferenças espectrais nos componentes lipídicos do soro sanguíneo de cães da raça Pastor de Shetland por meio da espectroscopia Raman, visando aplicações diagnósticas. Foram coletadas amostras de soro sanguíneo de cães (n=12) em dois momentos (0 e 24 h), e as concentrações de colesterol e triglicerídeos foram determinadas pelas técnicas de bioquímica convencional e espectroscopia Raman. Os dados foram analisados por PCA, para discriminação das variáveis, e PLS, para modelagem das concentrações lipídicas. As análises revelaram diferenças nas intensidades dos picos espectrais entre amostras com perfil lipídico normal e alterado, especialmente nas bandas atribuídas ao colesterol e triglicerídeos (643, 755, 890, 1003 e 1452 cm^{-1}). O modelo PLS apresentou correlação significativa para colesterol ($r = 0,721$) e triglicerídeos ($r = 0,761$), indicando que a espectroscopia Raman pode detectar e quantificar esses compostos. O PCA discriminou amostras com concentrações lipídicas alteradas, reforçando o potencial da técnica como ferramenta preditiva para diagnóstico de hiperlipidemia em cães, com possibilidade de aplicação em tempo real.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman. Diagnóstico. Soro sanguíneo. Cães. Colesterol. Triglicerídeos.

ABSTRACT

Primary hyperlipidemia in dogs is a condition frequently observed in veterinary clinical practice, characterized by increased serum concentrations of cholesterol and triglycerides, which may lead to cardiovascular and metabolic complications. Therefore, developing more efficient and accurate diagnostic methods for clinical monitoring and prevention is essential. This study aimed to evaluate spectral differences in lipid components of Shetland Sheepdog serum using Raman spectroscopy for diagnostic purposes. Blood serum samples from this dog ($n = 12$) were collected at two time points (0 and 24 h), and cholesterol and triglyceride concentrations were determined using conventional biochemical techniques and Raman spectroscopy. Data were analyzed using PCA for variable discrimination and PLS for lipid concentration modeling. The analyses revealed differences in spectral peak intensities between samples with normal and altered lipid profiles, particularly in bands attributed to cholesterol and triglycerides (643, 755, 890, 1003, and 1452 cm^{-1}). The PLS model showed significant correlations for cholesterol ($r = 0.721$) and triglycerides ($r = 0.761$), indicating that Raman spectroscopy can detect and quantify these compounds. PCA successfully discriminated samples with altered lipid concentrations, reinforcing the potential of Raman spectroscopy as a predictive tool for diagnosing hyperlipidemia in dogs, with real-time application feasibility.

Keywords: Raman spectroscopy, diagnosis, blood serum, dogs, cholesterol, triglycerides

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 O cão Pastor de Shetland	04
2.2 Espectroscopia Raman	04
2.3 Lipídios	07
3. OBJETIVOS	09
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 Amostras sorológicas	10
4.2 Exame convencional bioquímico	11
4.3 Espectrometria Raman	11
4.4 Análise espectral	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Cães da raça Pastor de Shetland no criatório comercial em São Paulo em momento de <i>solarium</i>	10
Figura 2 -	Representação esquemática das etapas realizadas nas análises sorológicas dos cães	14
Figura 3 -	Espectros Raman dos valores médios das amostras sorológicas de cães para os índices: colesterol normal (referência), colesterol alterado (aumentado), triglicerídeos normal (referência), triglicerídeos alterados (aumentado) com os espectros da diferença entre a média alterado – média referência	17
Figura 4 -	Espectros Raman da amostra sorológica do cão sete (7 e #7) do soro sanguíneo e com o pico de trioleína. O espectro desta amostra revelou picos de trioleína, sendo indicativo de alta concentração de triglicerídeos no soro	18
Figura 5 -	Gráficos das variáveis da PCA, caracterizando os PCs e Scores em amostras dos soros sanguíneos dos cães. Os Scores apresentam picos característicos dos componentes do soro sanguíneo: proteínas, lipídicos e aminoácidos encontrados nas amostras avaliadas. Os PCs mostraram diferenças estatísticas significativas entre os indivíduos normais e hiperlipidêmicos. O PC1 não mostrou diferenças estatisticamente significativas, e os demais PC2, PC3, PC4 e PC5 destacaram diferenças significativas entre os grupos, sugerindo diferenças nas X concentrações de lipídios, proteínas e aminoácidos.....	19
Figura 6 -	Correlação entre os valores obtidos de triglicerídeos e colesterol, adquiridos pelo método padrão convencional e os valores estimados via regressão PLS	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados dos exames, lipidograma e eritrograma, nas amostras sorológicas de cães através da técnica bioquímica convencional em dois momentos (zero e 24h)	16
Tabela 2 -	Acurácia na discriminação dos espectros nos grupos referência/normal e hiperlipidêmico, com a amostra #7, por análise discriminante PLS (PLS-DA)	21
Tabela 3 -	Acurácia na discriminação dos espectros nos grupos referência/normal e hiperlipidêmico, sem a amostra #7, por análise discriminante PLS (PLS-DA).....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau Celcius
cm ⁻¹	inverso de centímetro (número de onda; faixa espectral)
dL	decilitro
g	grama
h	hora
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mW	miliWatt
nm	nanometro
rpm	rotações por minuto
%	por cento

1 INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia é o aumento da concentração de lipídios no sangue, comum em cães e emergiu como uma condição clínica importante que requer abordagem diagnóstica precoce, para a melhor conduta terapêutica devido ausência de sintomas nos estágios iniciais da alteração metabólica (XENOULIS, STEINER, 2015). A hiperlipidemia pode ser primária ou secundária a outras doenças, sendo esta última a forma mais comum em cães e pode ser resultado de distúrbios endócrinos, pancreatite, colestase, nefropatias com perda proteica, obesidade, além de outras condições como o uso de certos medicamentos.

A forma primária, menos comum na população canina, tem alta prevalência em certas raças como Schnauzer Miniatura e Pastor de Shetland (BAUER, 2004; DE MARCO et al., 2017; BUNN et al. 2023). A hiperlipidemia em pequenos animais de companhia, como cães e gatos destaca-se na clínica médico veterinária e em comparação com os humanos, são tipicamente resistentes à doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e aterosclerose (BAUER, 2007). Estudos tem encontrado relações entre obesidade e desordens musculoesqueléticas, problemas cardiovasculares, intolerância a glicose, diabetes mellitus, câncer mamário com a prevalência de sobrepeso e obesidade nos caninos relatados entre 23% e 41% (LUND et al., 2006).

A hiperlipidemia é diagnosticada nos cães por exames sorológicos sanguíneos através das análises bioquímicas convencionais realizadas na rotina laboratorial onde as amostras são processadas e analisadas por kits comerciais (VILLM et al., 2023), mas apesar de ser a técnica mais executada informando os índices lipídicos sanguíneos esta não fornece características para um diagnóstico precoce preditivo, ou pode resultar em diagnósticos errôneos devido a metodologia empregada no processamento das análises (AZEVEDO et al., 2019).

Novas técnicas, para diferentes fins de diagnóstico com características moleculares com alta especificidade e sensibilidade, têm sido reportadas na área da saúde. Destas, a Espectroscopia Raman pode ser considerada uma ferramenta importante para rastrear alterações em populações específicas na investigação de particularidades (GIANSANTE et al., 2022), como os triglicerídeos e o colesterol nos cães.

A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento da luz que fornece informação sobre a composição molecular de uma substância. Seu fundamento reside na interação entre os

fótons incidentes e as vibrações moleculares das amostras analisadas, que por interação com as moléculas polarizadas pelos fótons, resultam em uma luz espalhada que possui desvio de frequência (o deslocamento Raman) causado pela modulação da vibração induzida pelos fótons e a vibração molecular. Esses deslocamentos Raman estão diretamente relacionados à estrutura molecular da substância, permitindo a identificação de compostos nas amostras, permitindo as análises de conformações moleculares e o estudo destas interações (GUAITA et al., 2014).

A Espectroscopia Raman aplicada em diferentes contextos para análises de fluidos biológicos para fins de diagnóstico, tais como, soro sanguíneo em humanos para os componentes triglicéridos e colesterol (BORGES et al., 2015), identificação hematológica normal e oncológica (LASKOWSKA et al., 2024), e nos animais a técnica já foi aplicada no soro sanguíneo como biomarcador de câncer (LOPES et al., 2024), diagnóstico de tumor mamário (MUNTEANU et al., 2017) em cães, e no diagnóstico de toxoplasmose no soro sanguíneo de gatos com a detecção das imunoglobulinas (DUARTE et al., 2010).

A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento da luz que fornece informação sobre a composição molecular de uma substância. Seu fundamento reside na interação entre os fótons incidentes e as vibrações moleculares das amostras analisadas, que por interação com as moléculas polarizadas pelos fótons, resultam em uma luz espalhada que possui desvio de frequência (o deslocamento Raman) causado pela modulação da vibração induzida pelos fótons e a vibração molecular. Esses deslocamentos Raman estão diretamente relacionados à estrutura molecular da substância, permitindo a identificação de compostos nas amostras, permitindo as análises de conformações moleculares e o estudo destas interações (GUAITA et al., 2014).

A espectroscopia Raman pode ser considerada uma metodologia importante para rastrear uma população, especialmente para triglicéridos e colesterol (GIANSANTE et al., 2021), técnica facilmente aplicada à análise de fluidos biológicos para a identificação de lipídios no soro sanguíneo permitindo a identificação de diferentes classes, como triglicéridos e colesterol, com alta especificidade, não destrutiva e de forma efetiva (BORGES et al., 2015), e oferece a vantagem de não requerer preparações complexas das amostras, tornando-a adequada para estudos clínicos (STEWART et al., 2012).

A determinação do perfil lipídico para identificação e quantificação no soro sanguíneo utilizando a espectroscopia Raman pode ajudar na avaliação de riscos cardiovasculares e no

diagnóstico de distúrbios metabólicos, tornando-a uma ferramenta valiosa no campo da medicina (GIANSANTE et al., 2021).

Trabalhos com identificação e/ou quantificação de componentes lipídicos em soro ou plasma de animais domésticos com o uso da espectroscopia Raman são escassos na literatura (ACRI et al., 2021), no soro sanguíneo de equinos analisaram antes e após corrida de obstáculos e identificaram variações nas intensidades dos picos na região de lipídios e proteínas (GIANNETTO et al., 2021), e ainda compararam a concentração sérica de lipídios, triptofano, aminoácidos, betacaroteno e ácido láctico antes e após exercício sugerindo que esses picos poderiam revelar o estado metabólico e identificar fadiga do equino (ACRI et al., 2023). A espectroscopia Raman tem sido explorada em pequenos animais como uma ferramenta promissora para diagnósticos menos invasivos e com potencial de alta sensibilidade. Em estudo realizado por Duarte et al. (2010), a técnica foi aplicada à análise do soro sanguíneo de gatos com e sem toxoplasmose, buscando correlacionar as alterações espectrais com os resultados obtidos pelo teste ELISA, considerado padrão ouro para o diagnóstico da doença. Os autores identificaram variações espectrais associadas à presença e à quantidade de anticorpos, demonstrando o potencial da espectroscopia Raman na detecção de infecções. Complementarmente, Shih et al. (2015) utilizaram a técnica para avaliação de glicose de forma minimamente invasiva em cães, por meio da coleta de espectros transcutâneos na veia auricular. Este estudo experimental reforça a aplicabilidade da espectroscopia Raman como uma alternativa viável para o monitoramento contínuo de parâmetros bioquímicos, ampliando seu uso na prática clínica veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cão da raça Pastor de Shetland

O cão da raça Pastor de Shetland, também conhecido como "Sheltie", é originário das Ilhas Shetland, situadas ao norte da Escócia. Acredita-se que sua ancestralidade esteja relacionada ao cruzamento entre cães do tipo Collie, levados às ilhas, e raças locais de pequeno porte, adaptadas ao clima rigoroso e à vida de trabalho com rebanhos. A seleção natural e artificial ao longo dos séculos resultou em um cão ágil, inteligente e de pequeno porte, ideal para o pastoreio de ovelhas nas paisagens acidentadas da região (PARKER et al., 2017).

Apesar de sua rusticidade e longevidade, o Pastor de Shetland apresenta predisposições genéticas a algumas condições metabólicas, entre elas a hiperlipidemia. Esta alteração é caracterizada por níveis elevados de lipídios no sangue, especialmente triglicerídeos e colesterol, e pode ocorrer de forma primária (hereditária) ou secundária a outras doenças, como hipotireoidismo e diabetes mellitus. Em Shelties, a hiperlipidemia primária tem sido descrita com relativa frequência, e estudos sugerem um padrão de herança poligênica, embora os mecanismos genéticos exatos ainda não estejam completamente elucidados (XENOULIS, STEINER, 2015).

A hiperlipidemia hereditária em cães da raça Pastor de Shetland geralmente é assintomática, mas pode predispor ao desenvolvimento de pancreatite, hepatopatia lipídica e alterações neurológicas. O diagnóstico é baseado em exames laboratoriais de perfil lipídico, e o manejo clínico inclui dieta com restrição de gorduras, controle de peso e, em alguns casos, o uso de fármacos hipolipemiantes (XENOULIS et al., 2010; 2020).

O conhecimento sobre a origem e as características genéticas da raça são fundamentais na prática clínica veterinária, tanto no aconselhamento de tutores quanto na prevenção de enfermidades associadas à predisposição racial.

2.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica baseada na dispersão inelástica da luz, descoberta por C.V. Raman, em 1928. É uma técnica que consiste em analisar a estrutura

vibracional das moléculas que constituem a amostra. Quando uma molécula é irradiada com luz monocromática, a maior parte da luz é espalhada elasticamente (dispersão Rayleigh), mas uma pequena fração sofre uma mudança na frequência devido à interação com as vibrações moleculares ou modos de rotação (BRZOZOWSKI, 2022). Essa mudança fornece informações únicas sobre a estrutura molecular, tornando o método valioso em diversas áreas da ciência.

O espalhamento Raman é um fenômeno espectroscópico que se baseia na interação da luz com as vibrações moleculares de uma amostra. Essa interação resulta no espalhamento inelástico de dos fótons, o que significa que há uma troca de energia entre a luz e as moléculas. O espalhamento Raman pode ser dividido em dois componentes principais: Stokes, em que nesse processo a frequência da luz espalhada é menor que a frequência da luz incidente, indicando que a molécula ganhou energia vibracional, e Anti-Stokes, nesse caso a frequência da luz espalhada é maior que a frequência da luz incidente, indicando que a molécula perdeu energia vibracional. Técnica analítica poderosa e versátil, com aplicações em diversas áreas para a identificação de compostos químicos e o estudo de reações químicas, que permite a obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura molecular, ligações químicas e grupos funcionais presentes em uma amostra (SMITH, DENT, 2019).

Na área biomédica, a espectroscopia Raman tem sido aplicada para o diagnóstico de doenças, análise de tecidos e caracterização de biomoléculas. A técnica oferece a vantagem de ser não destrutiva, minimamente invasiva quando for o caso e permitir a análise de amostras biológicas em seu estado natural (KRAFFT, NEUGEBAUER, 2012). A espectroscopia Raman é uma ferramenta essencial para o estudo de materiais avançados, como cristais, nanomateriais e estruturas como o grafeno. A técnica permite a caracterização de propriedades estruturais, vibracionais e eletrônicas de diferentes materiais (FERRARI, BACHMATIUK, 2013). Na área forense, a espectroscopia Raman tem sido utilizada para a identificação de drogas, explosivos e pigmentos com a vantagem de ser rápida e capaz de analisar amostras em diversas formas (VIRKLER, LEDNEV, 2010)

A Espectroscopia Raman aprimorada por Superfície (SERS) amplifica sinais usando superfícies metálicas nano estruturadas, imagens Raman 3D permitem a análise espacial de amostras complexas e a portabilidade dos equipamentos pelo desenvolvimento de espectrômetros portáteis para análises *in situ* (KNEIPP et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas de imagem Raman 3D permite a análise espacial de amostras complexas, fornecendo informações detalhadas sobre a distribuição de diferentes componentes em três dimensões. Essa

capacidade é particularmente útil em áreas como biologia celular, ciência dos materiais e na geologia (MATTHÄUS et al., 2010). Equipamentos portáteis permitem a realização de análises *in situ*, ou seja, no local onde a amostra se encontra. Essa portabilidade amplia as possibilidades de aplicação da espectroscopia Raman em áreas como controle de qualidade, segurança pública e exploração espacial. (LI et al., 2019).

A técnica espectroscopia Raman apresenta algumas limitações que podem afetar sua aplicabilidade em determinadas situações, tais como, sensibilidade, o efeito Raman é intrinsecamente fraco, o que significa que apenas uma pequena fração da luz incidente é espalhada inelasticamente, podendo resultar em sinais Raman fracos, especialmente para amostras com baixa concentração de analitos. Para superar essa limitação, diversas técnicas de amplificação têm sido desenvolvidas, como a Espectroscopia Raman Aprimorada por Superfície (SERS), que utiliza nanopartículas metálicas para aumentar a intensidade do sinal Raman (KNEIPP et al., 2002).

A fluorescência é um fenômeno que ocorre quando uma molécula absorve luz e, em seguida, emite luz em um comprimento de onda diferente. Em alguns materiais, a fluorescência pode ser muito mais intensa do que o sinal Raman, obscurecendo-o e dificultando a análise. Técnicas como Raman deslocado em superfície (SORS) e Raman pulsado têm sido desenvolvidas para minimizar a interferência da fluorescência (MATTHÄUS et al., 2010).

A espectroscopia Raman, combinada com técnicas de análise estatística multivariada PCA e PLS, foram utilizadas para identificar alterações bioquímicas em amostras de soro de cães com neoplasia em comparação com cães clinicamente saudáveis a fim de classificar as amostras saudáveis e neoplásicas. O espectro de diferença revelou picos atribuídos a proteínas e aminoácidos, especialmente albumina e fenilalanina, que foram mais intensos no grupo neoplasia, e picos de lipídios e triptofano, que foram mais intensos no grupo Saudável (LOPES et al, 2024).

Estudos mostraram que amostras de soro de humanos normais e alterados apresentaram bandas Raman e/ou regiões espectrais com diferenças significativas para exames bioquímicos no soro sanguíneo para colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL, ureia, creatinina e glicose, essas bandas espectrais coincidem com as bandas onde foram encontrados os picos Raman mais intensos em relação aos exames bioquímicos. A comparação entre a espectroscopia

Raman com a metodologia padrão baseada na contagem dos resultados obtidos por PLS quantitativo (STELLA et al., 2021).

2.3 Lipídios

O metabolismo dos lipídeos desempenha um papel fundamental na saúde dos cães, influenciando desde a produção de energia até a formação de componentes celulares essenciais. Alterações nesse metabolismo podem levar a diversas condições patológicas, tornando crucial a compreensão de suas vias metabólicas, métodos diagnósticos e possíveis consequências clínicas. Os lipídeos são nutrientes essenciais na alimentação de cães, desempenhando múltiplas funções fisiológicas fundamentais. Atuam como fonte concentrada de energia: cada grama de gordura fornece aproximadamente 9kcal, praticamente o dobro do aporte energético por grama da proteína ou do carboidrato ingerido. (BAUER, 2007). Os lipídeos são nutrientes essenciais na dieta canina, fornecendo energia e ácidos graxos necessários para várias funções fisiológicas. Triglicerídeos são os principais componentes lipídicos da dieta e servem como fonte de ácidos graxos utilizados na síntese de outros lipídeos importantes, como fosfolipídeos que desempenham um papel crucial na sinalização celular e são substratos para enzimas específicas durante a produção de mediadores de respostas imunológicas. Estudos destacam a influência de ácidos graxos das séries ômega-3 e ômega-6 nas respostas inflamatórias em cães (TREVIZAN, KESSLER, 2009).

A avaliação do perfil lipídico e lipoprotéico é essencial para diagnosticar alterações no metabolismo de lipídeos em cães. Um estudo com cães portadores de doença hepática revelou que, embora os níveis séricos de colesterol permanecessem normais, houve um aumento nos triglicerídeos e alterações nas lipoproteínas, como diminuição de HDL e aumento de VLDL e LDL. Essas alterações sugerem que a avaliação detalhada do perfil lipoprotéico é mais sensível na detecção de disfunções hepáticas e metabólicas do que a análise isolada de lipídeos (KITAMURA, 2008).

As consequências clínicas das alterações no metabolismo lipídico podem acarretar aos cães desvios no metabolismo podem resultar em diversas condições clínicas, por exemplo, a obesidade está frequentemente associada ao consumo excessivo de ácidos graxos de cadeia média, que proporcionam maior incremento calórico durante o processo de oxidação celular, a deficiência de ácidos graxos essenciais, como o ácido araquidônico, pode comprometer a

integridade das membranas celulares e a produção de eicosanoides, afetando processos inflamatórios e imunológicos (TREVIZAN, KESSLER, 2009).

Alterações no perfil lipoprotéico, como redução de HDL e aumento de LDL, predispõem os cães a doenças cardiovasculares e hepáticas. Alterações nesse metabolismo podem ter consequências significativas, ressaltando a importância de diagnósticos precisos e intervenções dietéticas adequadas para prevenir e tratar possíveis disfunções. (KITAMURA, 2008).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar as características espectrais de lipídios no soro sanguíneo de cães através da espectroscopia Raman para diagnóstico preditivo de hiperlipidemia primária.

Objetivos Específicos

- Caracterizar através dos picos obtidos do soro sanguíneo de cães, para o perfil lipídico por espectroscopia Raman;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da espectroscopia Raman frente ao exame sorológico padrão para a hiperlipidemia em cães;
- Avaliar a espectroscopia Raman como uma ferramenta para o diagnóstico preditivo para a hiperlipidemia em cães.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras sorológicas

Cães (n=12) da raça Pastor de Shetland, de ambos os sexos, com idade entre 4 e 8 anos, de um criatório comercial em SP/Brasil, fizeram parte da investigação deste estudo (projeto aprovado CEUA nº 005/2022). Estes animais eram acompanhados rotineiramente com *checkups* anuais, por fazerem parte de uma matilha de canil.

Os animais estavam todos dentro da média de escore corporal da raça, não ultrapassando os 10kg de peso vivo, com estaturas dentro do padrão da raça (35cm a 37cm) de cernelha entre machos e fêmeas, de acordo com as normas do *American Sheepdog Association* (<https://www.americanshetlandsheepdogassociation.org>). Eram alimentados duas vezes por dia com ração peletizada da marca Premier Ambientes Internos, com composição de 100% de umidade, 26% de Proteína Bruta, 16% de extrato etéreo, 7% de matéria mineral e 3% de matéria fibrosa, segundo dados do fabricante, essa alimentação foi oferecida de acordo com a faixa etária de cada cão.

Os Pastores de Shetland vivem em ambiente combinado, com *solarium* ao ar livre e baias teladas, fechadas. Faziam atividades físicas rotineiramente onde permaneciam soltos a maior parte do tempo em áreas gramadas e recebiam água fresca *ad libitum* (Figura 1).



Figura 1: Cães da raça Pastor de Shetland no criatório comercial em São Paulo em momento de *solarium*.

Foram coletadas duas amostras do sangue periférico (3mL) de cada cão, em jejum alimentar por 12h, em dois momentos: zero e 24h após a primeira coleta, totalizando 24 amostras sorológicas sanguíneas de cães (n=24). Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e enviadas ao laboratório veterinário para o processamento das amostras.

No laboratório as amostras foram centrifugadas por 5min a 7.000rpm (model DM0424), e na sequência o soro sanguíneo formado foi separado em duas frações, uma fração foi encaminhada para os exames convencionais bioquímicos e a segunda fração foi congelada a -20°C para as análises por espectroscopia Raman.

4.2 Exame convencional bioquímico

Exames sanguíneos foram realizados no momento zero para eritrograma e lipidograma, e em 24h após a primeira coleta foi realizado apenas o lipidograma aferindo o colesterol e triglicérides, através dos kits comerciais (Ref. 76 – Colesterol Liquiform, Ref. 87 – Triglicerídeos, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) para ambos os momentos de coletas.

No laboratório, as amostras de sangue foram processadas conforme a rotina convencional. Inicialmente foram transferidas para tubos de coleta com gel ativador de coágulos (tubo para coleta de sangue à vácuo, Cral Artigos para Laboratórios Ltda., Cotia, SP, Brasil) e centrifugadas por 5min a 7.000rpm (DM0424, MH Equipamentos e Materiais para Laboratório Ltda., São Paulo, SP, Brazil), e o soro foi separado em duas frações, uma fração foi encaminhada para o exame bioquímico convencional e a segunda fração foi armazenada e congelada a -20°C para posterior análise por espectroscopia Raman. Considerou-se uma margem total analítica entre 4% e 5 % de erro dos resultados (BASQUEZ, 2016 - Guia técnico Labtest).

4.3 Espectroscopia Raman

As amostras do soro sanguíneo de cada animal foram congeladas e enviadas ao laboratório para serem submetidas à espectroscopia Raman, após o descongelamento em

temperatura ambiente foi utilizado o equipamento espectrômetro Raman dispersivo (modelo P-1, Lambda Solutions, Inc., Waltham, MA, EUA).

O espectrômetro possui um laser de diodo (excitação 830nm, potência 450mW) acoplado a uma sonda Raman (modelo Vector Probe, Lambda Solutions, Inc.) para excitação da amostra e coleta dos espectros, obtendo-se na saída do *probe* cerca de 400mW. O espectrômetro possui um espectrógrafo com grade de difração de alta eficiência e uma câmera CCD “back thinned, deep-depletion” de 1340x100 pixels refrigerados (-75°C), que fornecem uma resolução de aproximadamente 2cm^{-1} , na faixa espectral útil de 400cm^{-1} a 1800cm^{-1} .

Na aquisição dos espectros, os parâmetros referentes ao tempo de coleta do sinal e potência do laser foram ajustados para otimizar a relação sinal-ruído a partir das características espalhadoras do soro e minimizar a incidência de raios cósmicos. O tempo de coleta foi ajustado para 30’’ (10 acumulações de 3’’), e a potência do laser foi ajustada para 350mW.

Os espectros foram pré-processados para evidenciar as características Raman do soro. Os picos de raios cósmicos foram removidos manualmente, a linha de base devido à fluorescência de banda larga foi removida ajustando e subtraindo um polinômio de 7ª ordem à linha de base, e a normalização pela área sob a curva (1-norm) foi realizada (LASCH et al., 2012).

4.4 Análise espectral

Após o pré-processamento dos espectros, os dados foram submetidos às técnicas multivariadas PCA e PLS. A técnica PCA é uma abordagem estatística que tem como objetivo reduzir a dimensionalidade dos dados, ao mesmo tempo em que procura preservar a máxima variabilidade presente no conjunto de dados. Para se determinar os componentes principais e apresentar diferenças estatisticamente significantes em suas intensidades entre as amostras, empregou-se o software Chemoface (NUNES et al., 2012) que foi usado para identificar os picos que foram obtidos nas amostras e correlacionados com os picos com alterações bioquímicas de triglicerídeos e colesterol (LIMA, 2023).

A PCA reduz a dimensionalidade ao mesmo tempo em que mantém as informações mais importantes, pois determina as direções dos eixos de maior variabilidade nos dados. A

regressão por PLS também é uma ferramenta estatística multivariada que visa estabelecer a correlação entre um conjunto de variáveis independentes e uma variável dependente. A PLS também calcula a matriz de covariância, porém utiliza a informação da variável dependente para obter os fatores de regressão (CHEIN, 2019). É amplamente utilizada em análise quimiométrica em química analítica, e a espectroscopia Raman se beneficia pois possui alta dimensionalidade e é comum a correlação entre variáveis, como no caso de espectros de soro sanguíneo, onde colesterol e triglicerídeos podem estar alterados em conjunto

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é uma extensão do PLS que se destaca na classificação e discriminação de dados multivariados, comumente empregada em estudos de quimiometria e biologia. O PLS visa identificar combinações lineares das variáveis independentes que maximizam a separação entre diferentes grupos de amostras, permitindo a criação de modelos de classificação altamente eficazes.

Esquema representativo de todas as fases analisadas encontra-se na Figura 2.

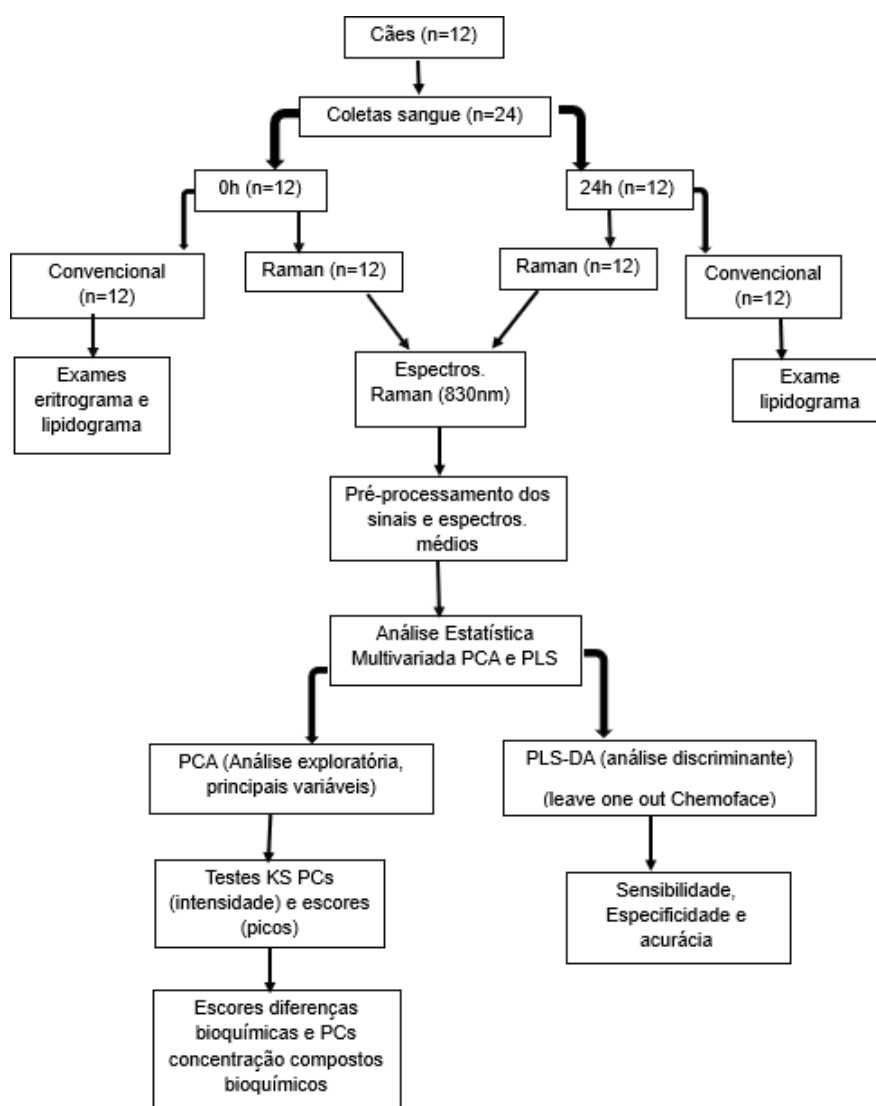


Figura 2: Representação esquemática das etapas realizadas nas análises sorológicas dos cães.

Os índices estatísticos obtidos através da análise PCA e PLS, as variáveis da PCA, caracterizaram os PCs e Scores em amostras dos soros sanguíneos dos cães. Os Scores apresentam picos característicos dos componentes do soro sanguíneo: proteínas, lipídicos e aminoácidos encontrados nas amostras avaliadas. E a regressão PLS foi utilizada para determinar as concentrações dos elementos bioquímicos: triglicerídeos e colesterol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se, pelos exames sanguíneos convencionais, eritrograma e lipidograma nos momentos zero e 24h após a primeira coleta, que todos os cães estavam clinicamente bem e com os valores médios e desvios padrões dentro dos valores de referência de normalidade para a espécie canina, como apresentados na Tabela 1.

Os índices de referências para cães saudáveis para o colesterol e triglicerídeos estão compreendidos em 125mg/dL a 270mg/dL e 20mg/dL a 112mg/dL respectivamente (PERTSEMLIDIS et al., 1973; USUI et al., 2014), nas amostras 2, #2, 6, #6, 9, #9, 12 e #12 para os índices de colesterol avaliados em 24h quando comparados ao momento zero observou-se uma grande variação nos valores encontrados, o mesmo foi observado para as amostras 3, #3, 5, #5, 9 e #9 em relação aos triglicerídeos. Alguns distúrbios primários do metabolismo do colesterol como a deficiência do receptor LDL e os distúrbios da apolipoproteína foram relatados em cães da mesma raça deste estudo, com ausência de sintomatologia clínica mesmo com índices muito elevados e com a identificação da lipoproteína-colesterol no plasma (SATO et al., 2000), dados sugestivos também para este estudo, mas um número maior de animais deverá ser testado para fins de comprovação.

Sabe-se que cães da raça pastores de Shetland demonstraram nos estudos de Mori et al. (2010) resultados significativamente diferentes para a obesidade e doenças hepáticas, há uma correlação direta quanto maior o escore corporal do animal para a obesidade maior será o comprometimento metabólico hepático com alterações enzimáticas específicas produzidas no fígado, tais dados não foram comprovados nesta pesquisa, pois todos os animais estavam com os escores corporais adequados, não apresentavam obesidade ou com sobrepeso, e praticavam atividades físicas regularmente mantendo a aptidão de pastoreio da raça. Sabe-se que os níveis de colesterol, triglicerídeos são aumentados em cães obesos, mas novos estudos deverão ser conduzidos com um número maior de animais visando caracterizar a obesidade e hiperlipidemia primária, pois 58% dos animais estavam com pelo menos um dos exames do lipidograma alterados mesmo assintomáticos, sabe-se que a positividade para proteína C Reativa (PCR) e a resistência à insulina em cães são inibidas com a obesidade canina (VEIGA et al., 2007) dados que não foram pesquisados neste estudo.

Tabela 1. Resultados dos exames, lipidograma e eritrograma, nas amostras sorológicas de cães através da técnica bioquímica convencional em dois momentos (zero e 24h).

Animal	Lipidograma		Eritrograma					
	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeo (mg/dL)	Eritrócitos (10 mm)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócitos (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	Proteína Total (g/dL)
1	242	158	5	12	36	72	33,33	10,4
#1	248	140	-	-	-	-	-	-
2	186	217	6	14	42	70	33,33	8,5
#2	271	225	-	-	-	-	-	-
3	170	64	7,13	16	48	67,32	33,33	7,7
#3	167	97	-	-	-	-	-	-
4	498	112	5,55	12,3	36	64,86	35,15	7,1
#4	434	95	-	-	-	-	-	-
5	200	25	6,94	14,9	44	63,4	33,86	7,8
#5	191	115	-	-	-	-	-	-
6	409	118	7,09	14,9	43	60,65	34,65	8
#6	278	138	-	-	-	-	-	-
7	255,3	82,3	7,64	18,1	51	66,75	35,49	8
#7	243	80,5	-	-	-	-	-	-
8	259	94,5	9,43	18,5	52	55,14	35,58	8,8
#8	293	107	-	-	-	-	-	-
9	242	51	7,45	15,8	47	63,09	33,62	8,4
#9	337	123	-	-	-	-	-	-
10	197	71	8,66	18,8	55	63,51	34,18	9,5
#10	189	81	-	-	-	-	-	-
11	240	45	7,95	16,4	47	59,12	34,89	8,5
#11	251	62	-	-	-	-	-	-
12	342,3	58,7	6,23	12,9	37	59,39	34,86	8,5
#12	233	66	-	-	-	-	-	-
Média	262	105	7,09	15,4	44,8	63,8	34,4	8,43
DP	4,5	46	1,27	2,33	6,34	8,92	1,08	1,34
Val de ref.	125 a 270	20 a 112	5,5 a 8,5	12,0 a 18,0	37 a 55	60 a 77	19,5 a 24,5	30 a 36

#Amostras no momento 24h após a primeira coleta; DP=desvio padrão. Val de ref. = valor de referência

Com relação aos resultados da espectroscopia Raman, os espectros médios dos animais para os índices: colesterol normal (referência), colesterol alterado (aumentado), triglicerídeos normal (referência), triglicerídeos alterados (aumentados) e os respectivos espectros da diferença entre a média alterado – média referência estão representados na Figura 3.

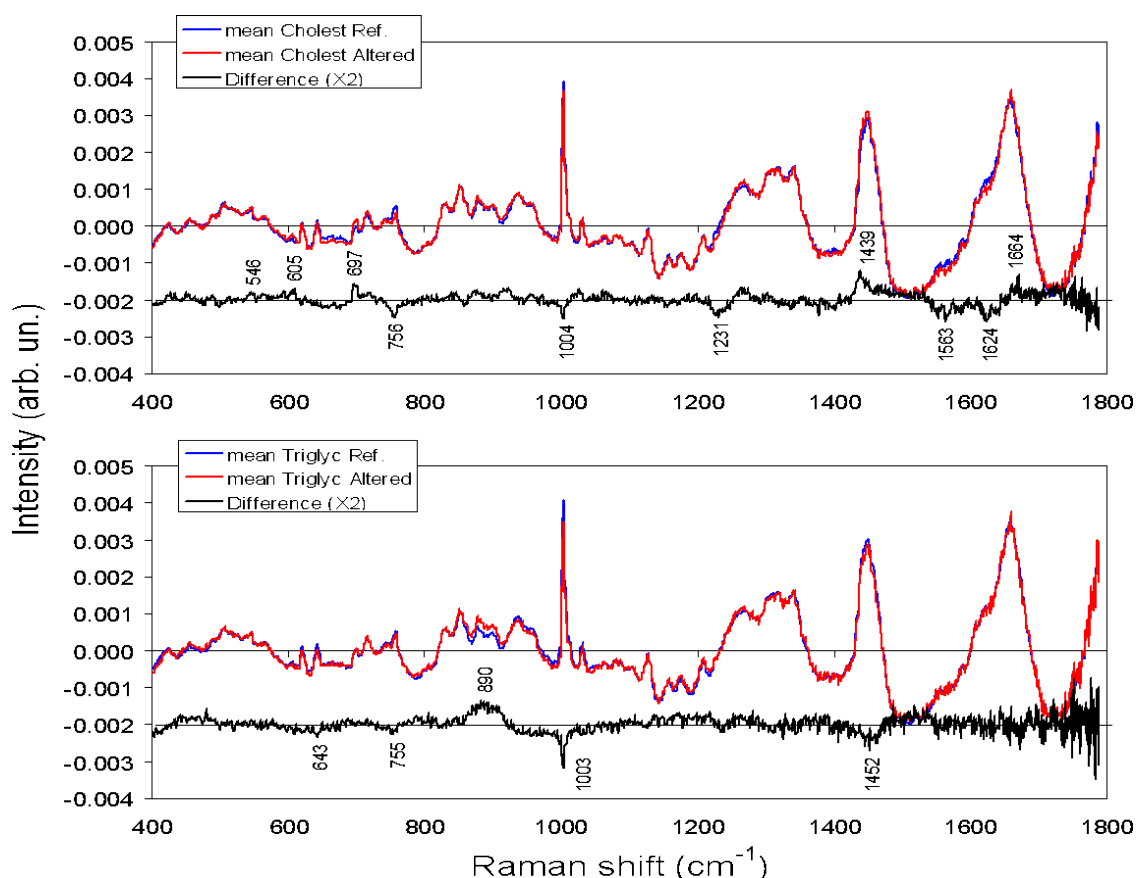


Figura 3. Espectros Raman dos valores médios das amostras sorológicas de cães para os índices: colesterol (valores de referência), colesterol alterado (aumentado), triglicerídeos (valores de referência), triglicerídeos alterados (aumentado) com os espectros da diferença entre a média alterado – média referência.

No espectro da diferença média para as análises do colesterol, os picos positivos em 546, 605, 697, 1439 e 1664 cm^{-1} atribuídos ao colesterol (STELLA et al., 2021) foram maiores no grupo alterado, enquanto os picos em 756, 1004, 1231 e 1563 e 1624 cm^{-1} atribuídos aos aminoácidos contendo anéis aromáticos (triptofano e fenilalanina) foram maiores no grupo referência (BORGES et al., 2015).

A presença de picos de colesterol na diferença dos espectros, indicam que a técnica Raman foi capaz de identificar a maior concentração deste componente bioquímico nestas

amostras alteradas. No espectro da diferença para os triglicerídeos, o pico positivo em 890 cm^{-1} , atribuído a trioleína (STELLA et al., 2021) foi maior no grupo com perfil lipídico bioquímico acima dos valores de referência (20mg/dL a 112mg/dL), enquanto os picos em 643 , 755 , 1003 e 1452cm^{-1} atribuídos a aminoácidos contendo anéis aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) (AGUIAR et al., 2022), foram evidenciados no grupo de animais que apresentaram um perfil hiperlipídico bioquímico dentro dos valores de referência (20mg/dL a 112mg/dL). A presença de apenas um pico atribuído a triglicerídeos no espectro da diferença pode ser devido ao fato de que três dos 12 animais estavam com valores acima da referência. Os picos mais intensos da trioleína em 1302 , 1441 e 1660cm^{-1} não foram observados no espectro da diferença.

As amostras sorológicas do cão sete (7 e #7) apresentaram espectro Raman com picos característicos de trioleína (Figura 4), mas na análise bioquímica, esse animal apresentava-se com o perfil lipídico dentro dos valores de referência para a normalidade para a espécie. Essa situação pode ter influenciado o não aparecimento de picos de trioleína na diferença alterada – referência para os triglicerídeos como apresentado na Figura 4, pois esses picos podem ter se subtraído pela presença em ambos os grupos.

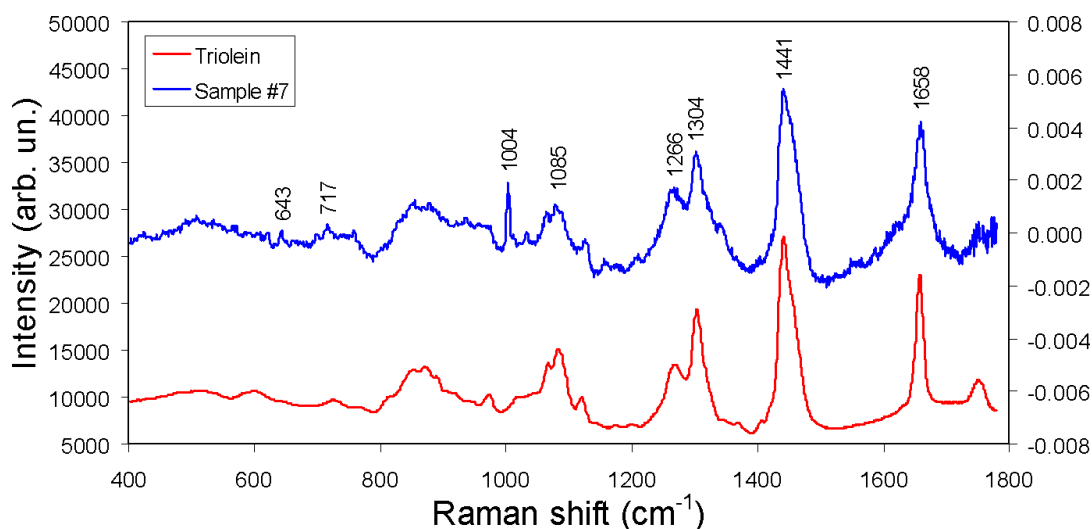


Figura 4. Espectros Raman da amostra sorológica do cão sete (7 e #7) do soro sanguíneo e com o pico de trioleína. O espectro desta amostra revelou picos de trioleína, sendo indicativo de alta concentração de triglicerídeos no soro.

A análise exploratória por meio da PCA com o objetivo de identificar as diferenças espectrais entre os grupos: “normal” (valores de referência) e “hiperlipêmicos” (acima dos valores de referência). Os Scores e PCs de 1 a 5 (Figura 5) foram os que apresentaram picos que poderiam ser associados a constituintes do soro sanguíneo; os Scores acima de 5 não apresentaram picos e foram caracterizados por ruídos. As características espectrais vistas nos Scores podem ser atribuídas a constituintes séricos, como albumina, globulinas, outras proteínas séricas, aminoácidos e lipídios incluindo triglicerídeos e colesterol.

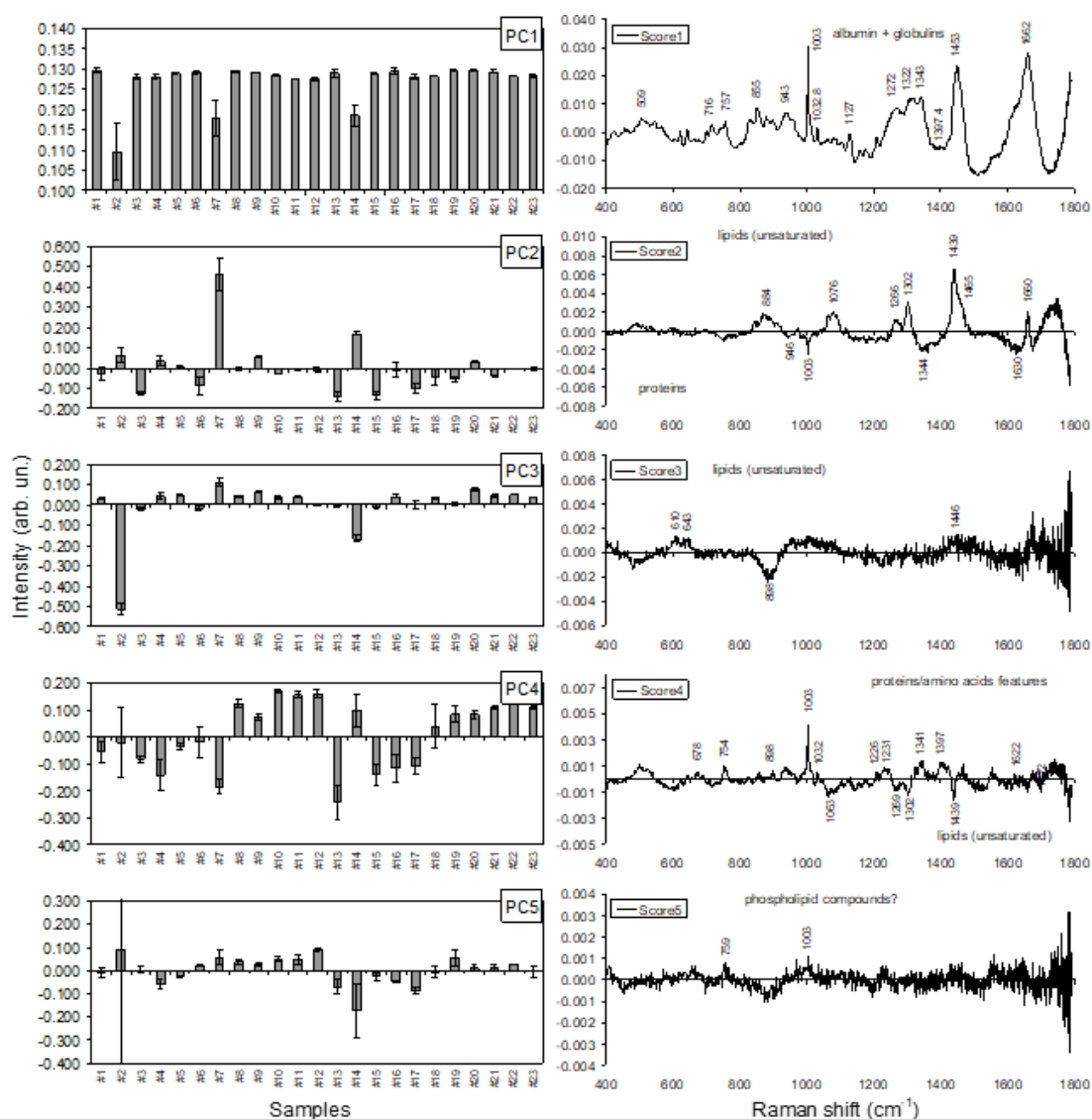


Figura 5. Gráficos das variáveis da PCA, caracterizando os PCs e Scores em amostras dos soros sanguíneos dos cães. Os Scores apresentam picos característicos dos componentes do soro sanguíneo: proteínas, lipídicos e aminoácidos encontrados nas amostras avaliadas. Os PCs mostraram diferenças estatísticas significativas entre os indivíduos normais e hiperlipidêmicos. O PC1 não mostrou diferenças estatisticamente significativas, e os demais PC2, PC3, PC4 e PC5 destacaram diferenças significativas entre os grupos (0 – 24h) sugerindo diferenças nas concentrações de lipídios, proteínas e aminoácidos.

O Score 1 apresentou picos em 509, 716, 757, 855, 943, 1032,8, 1003, 1127, 1272, 1322, 1343, 1397, 1453 e 1662cm⁻¹, que podem ser atribuídos a albumina e globulinas (ATKINS et al, 2017). O PC1 indicou que as amostras 1, #3, #4, 7, #8, estavam com a concentração de albumina e globulina aumentadas, enquanto as amostras, #1, 4, #7, estavam diminuídas.

O Score 2 apresentou picos em 884, 1076, 1266, 1302, 1439 e 1660cm⁻¹, que podem ser atribuídos a lipídios (insaturados), e picos em 946, 1003, 1344, 1633cm⁻¹, que podem ser atribuídos a proteínas. O PC2 indicou que as amostras 4 e #7 estavam com as concentrações de lipídios insaturados aumentadas, e as amostras 2, #3, 7, #8, 9 sugeriam maior concentração de proteínas. O Score 3 apresentou picos positivos em 610, 643, 1446cm⁻¹, atribuídos a proteínas/aminoácidos, e pico negativo em 898cm⁻¹, atribuído a lipídios. O PC3 indicou que a amostra 4 também apresentava proteínas e aminoácidos aumentados, enquanto as amostras #1 e #7 apresentavam lipídios aumentados.

O Score 4, apresentou picos positivos em 678, 754, 898, 1003, 1226, 1231, 1341, 1397 e 1622cm⁻¹ caracterizando proteínas e aminoácidos, e picos em 1063, 1269, 1302 e 1439 cm⁻¹, caracterizando lipídios. O PC4 destacou que as amostras #5, 6, #6 e #12, com concentração de proteínas e aminoácidos aumentados, e amostra 4, com concentração de lipídios aumentada. O Score 5 apresentou os picos positivos em 759 e 1003cm⁻¹, sugerindo presença de compostos lipídicos (fosfolipídios?), no PC5 verificou-se que as amostras #1 e #6 apresentaram maior concentração desse composto. PCA sugeriu que existem diferenças bioquímicas entre os indivíduos hiperlipêmicos e normais, principalmente em relação a proteína e lipídios.

Em relação a regressão PLS foi usada para determinar as concentrações dos elementos bioquímicos: triglicerídeos, colesterol, com validação cruzada do tipo *leave one out*. A Figura 6 apresenta as concentrações previstas pelo modelo PLS *versus* as concentrações determinadas pela espectrofotometria. Observou-se que há uma boa correlação entre os dados obtidos nos Scores e nos PC's, evidenciando positivamente o uso do Laser Raman como possibilidade diagnóstica.

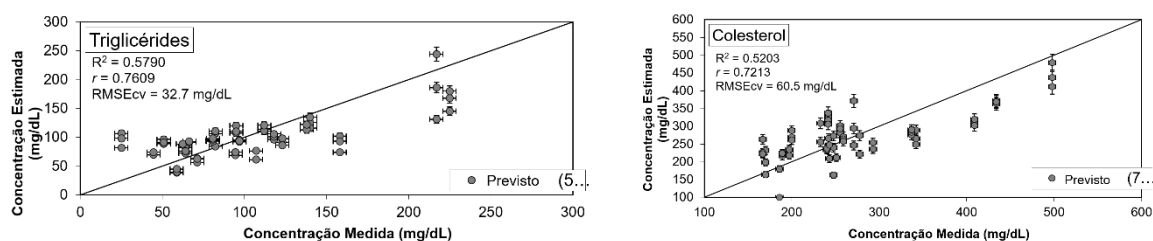


Figura 6. Correlação entre os valores obtidos de triglicerídeos e colesterol, adquiridos pelo método padrão convencional e os valores estimados via regressão PLS.

Houve uma boa correlação entre as concentrações dos constituintes triglicerídeos e colesterol obtidos no exame convencional com os obtidos no modelo de regressão PLS ($r = 0,761$ para triglicerídeos e $r = 0,721$ para colesterol), sugerindo que esses compostos podem ser detectados e quantificados pela espectroscopia Raman.

A regressão PLS também foi empregada para a classificação. Os espectros foram classificados em dois grupos (referência/normal e hiperlipidêmicos) usando o modelo PLS-DA. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, em que a Tabela 2 com o soro sanguíneo do animal #7 e a Tabela 3 sem soro sanguíneo do animal #7.

Tabela 2. Acurácia na discriminação dos espectros nos grupos referência/normal e hiperlipidêmico, com a amostra #7, por análise discriminante PLS (PLS-DA).

Classificação Colorimetria	Classificação PLS-DA (6 LVs)		Classificação PLS-DA (3 LVs)	
	Referência	Hipertrigliceridemia	Referência	Hipercolesterolemia
Referência	41	1	39	1
Hipertrigliceridemia / hipercolesterolemia	10	10	12	10
Sensibilidade	50.0 %		45.4 %	
Especificidade	97.6 %		97.5 %	
Acurácia	82.3 %		79.0 %	

Tabela 3. Acurácia na discriminação dos espectros nos grupos referência/normal e hiperlipidêmico, sem a amostra #7, por análise discriminante PLS (PLS-DA).

Classificação Colorimetria	Classificação PLS-DA (5 LVs)		Classificação PLS-DA (2 LVs)	
	Referência	Hipertrigliceridemia	Referência	Hipercolesterolemia
Referência	38	1	32	5
Hipertrigliceridemia / hipercolesterolemia	10	10	7	15
Sensibilidade	50,0 %		68,2 %	
Especificidade	97,4 %		86,0 %	
Acurácia	81,3 %		79,7 %	

Sem o espectro da amostra sorológica do cão #7 o modelo PLS-DA otimiza a classificação dos animais hiperlipidêmicos pois modela melhor esse grupo, já que essa amostra (#7) aparenta ser um “outlier” e desloca o grupo em sua direção. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, aferiu-se quantitativamente e qualitativamente a caracterização que a espectroscopia Raman, identificando picos de colesterol em 546, 605, 697, 756, 1004, 1231, 1439, 1563, 1624 e 1664 cm^{-1} , e triglicerídeos em 643, 755, 890, 1003 e 1452 cm^{-1} . Em humanos, picos de lipídeos e lipoproteínas já foram identificados através do soro sanguíneo, com picos em 877, 1004, 1271, 1307, 1343, 1451 e 1659 cm^{-1} (BORGES, 2015).

Esses valores, se assemelham aos picos encontrados em diversos trabalhos onde foram utilizados soro sanguíneo humano. Assim a espectroscopia Raman se sobressai em relação aos exames bioquímicos convencionais devido a rápida análise das amostras do soro sanguíneo em relação ao tempo de processamentos das leituras de diagnóstico.

Trabalhos com identificação e/ou quantificação de componentes lipídicos em soro ou plasma de animais domésticos com o uso da espectroscopia Raman ainda são escassos na literatura (ACRI et al. 2021). O soro sanguíneo de cavalos antes e após corrida de obstáculos foram avaliadas e identificadas as variações nas intensidades dos picos na região de lipídios e proteínas (triptofano) (GIANNETO et al., 2022), esses picos podem revelar o estado metabólico e identificar fadigas musculares nos animais em treinos (ACRI et al., 2023). Em pequenos animais a espectroscopia Raman já foi testada para analisar o soro sanguíneo de gatos com e sem toxoplasmose visando correlacionar o diagnóstico padrão ouro, Teste ELISA, com as

alterações espectrais decorrentes da presença e quantidade de anticorpos (Duarte, et al., 2010), proposta também deste estudo em comparar as técnicas de diagnósticos, padrão e Raman, e em estudo com amostras transcutâneas na análises não invasiva de aferição de glicose utilizando o modelo experimental, com cães, para a obtenção dos espectros Raman através das coletas de sangue periférico pela veia auricular (SHIH et al., 2015).

A espectroscopia Raman também pode ser aplicada, na avaliação das diversas fontes de proteínas utilizadas na ração animal, qualificando as características lipídicas de cada uma delas (GAO, et al., 2018) e na identificação de sangue de várias espécies animais. (McLAAUGHLI et al., 2014).

A realização da anamnese não permite identificar a priori a existência da hiperlipidemia, pois uma característica dessa condição é a ausência de sintomas. A espectroscopia Raman pode surgir como uma técnica de rastreamento de alterações metabólicas como as que ocorrem nos cães da raça Pastor de Shetland, possibilitando um diagnóstico mais assertivo para futuras doenças, sendo uma opção segura, rápida com sensibilidade e especificidade do que a técnica convencional padrão, tornando-se uma ferramenta valiosa aos profissionais na identificação precocemente das alterações nos níveis lipídicos, possibilitando adotar estratégias terapêuticas mais eficazes visando o bem-estar e sanidade animal de forma mais direcionada.

A espectroscopia Raman, apresenta grande potencial para ser empregada em estudos futuros voltados ao diagnóstico de diversas patologias comuns em cães e em outras espécies animais. Além da hiperlipidemia, cujas alterações bioquímicas podem ser prontamente detectadas por meio de variações nos picos vibracionais de lipídios plasmáticos, essa técnica poderá ser adaptada para investigar marcadores espectrais associados a condições como diabetes mellitus, câncer, doenças hepáticas e renais, bem como infecções bacterianas ou fúngicas. Por exemplo, em casos de animais atletas e animais sedentários, uma urinálise como já fora realizada em humanos (MOREIRA et al., 2017), também em casos de diabetes, modificações na composição glicídica e na estrutura proteica do sangue ou de fluidos biológicos poderiam ser correlacionadas a padrões Raman característicos da hiperglicemia e do estado inflamatório crônico associado. De maneira semelhante, tumores podem exibir perfis Raman distintos em relação ao tecido saudável adjacente, permitindo diferenciação precoce entre lesões benignas e malignas, bem como o acompanhamento da resposta a terapias antineoplásicas.

Em felinos, suínos, aves e bovinos, a espectroscopia Raman também tem grande aplicabilidade potencial. Em bovinos, por exemplo, pode-se monitorar alterações na

composição lipídica e proteica do leite para diagnóstico precoce de mastite; em aves, a técnica poderia auxiliar na detecção de enfermidades respiratórias ao identificar alterações no perfil molecular do muco traqueal; e em suínos, pode-se avaliar mudanças metabólicas associadas à síndrome respiratória e reprodutiva do suíno (PRRS). Além disso, amostras não invasivas, como saliva, urina ou até fragmentos superficiais de pele, podem ser analisadas *in vivo* ou *ex vivo*, possibilitando o rastreamento de doenças em populações inteiras sem a necessidade de intervenções que causem estresse aos animais. Dessa forma, a espectroscopia Raman se configura como uma ferramenta versátil e promissora, cujas aplicações diagnósticas podem ser amplamente exploradas em trabalhos futuros, não apenas em cães (SILVEIRA JUNIOR et al., 2017), mas em todo o espectro de espécies de importância clínica e econômica.

6 CONCLUSÕES

A espectroscopia Raman foi capaz de identificar hiperlipidemia nos cães da raça Pastor de Shetland por meio dos picos em 546, 605, 697, 1439, 1664 e 756, 1004, 1231, 1563 e 1624 cm^{-1} , associados a triglicerídeos nos espectros médios nos momentos 0h e 24h. O soro sanguíneo dos cães foi caracterizado mediante a espectroscopia Raman, dentro do perfil lipídico e a diferença entre os valores referência de normalidade e os valores indicativos de hiperlipidemia correlacionados com colesterol e trioléina. O PCA permitiu identificar os picos 890 cm^{-1} e 643, 755, 890, 1003, 1452 cm^{-1} , compostos vistos no espectro e PLS com correlação à normalidade e à hiperlipidemia, com alta especificidade nos grupos de referência e hiperlipidêmicos. A técnica de espectroscopia Raman mostrou-se promissora em relação às análises dos parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo de cães, podendo ser utilizada para diagnóstico preditivo a fim de estabelecer medidas preventivas visando a saúde dos animais.

REFERÊNCIAS

- ACRI, G.; TESTAGROSSA, B.; GIUDICE, E.; ARFUSO, F.; PICCIONE, G.; GIANNETTO, C. Application of Raman Spectroscopy for the Evaluation of Metabolomic Dynamic Analysis in Athletic Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 96, p. 103319, jan. 2021.
- ACRI, G.; TESTAGROSSA, B.; PICCIONE, G.; ARFUSO, F.; GIUDICE, E.; GIANNETTO, C. Central and Peripheral Fatigue Evaluation during Physical Exercise in Athletic Horses by Means of Raman Spectroscopy. **Animals** (Basel), v. 13, n. 13, p. 2201, 2023.
- AGUIAR, R. P.; FALCÃO, E. T.; PASQUALUCCI, C. A. et al. Use of Raman spectroscopy to evaluate the biochemical composition of normal and tumoral human brain tissues for diagnosis. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 1, p. 121–133, 2022.
- AZEVEDO, C. N.; LIDBURY, J. A.; JEFFERY, U. Effects of marked hypertriglyceridemia and lipid clearance techniques on canine biochemistry testing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 4, p. 546–553, 2019.
- BASQUEZ, F.W.A. **Guia técnico bioquímico Labtest**. Lagoa Santa: Labtest, ref. 13, p. 38, 2016.
- BAUER, J.E. Lipoprotein-mediated transport of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 224(5), p. 668-75, Jan 2004.
- BAUER, J.E. Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 11, p. 1657–1661, 2007.
- BORGES, R. de C. F.; NAVARRO, R. S.; GIANA, H. E.; TAVARES, F. G.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA JUNIOR, L. Detecting alterations of glucose and lipid components in human serum by near-infrared Raman spectroscopy. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 1680–1681, 2015.
- BRZOSOWSKI, J.; MATUSZYK, E.; PIECZARA, A.; FIRLEJ, J.; NOWAKOWSKA, A. M.; BARANSKA, M. Stimulated Raman Scattering Microscopy in Chemistry and Life Science – Development Innovation, Perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 60, p. 108003, nov. 2022.
- BUNN, T.; LANGNER, K.; FOSTER, S.; HAYWARD, D.; HOWARD, G.; PALTRINIERI S.; GIORDANO A.; ROSSI G. Lipoprotein profiles in Miniature Schnauzer dogs with idiopathic hypertriglyceridemia and hypercortisolism. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 36, n. 2, p. 205, Mar 2023
- CHEIN, F. **Introdução aos modelos de regressão linear: um passo inicial para compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas**. Brasília: Enap, 2019. 76 p.

De MARCO, V.; NORONHA, K. S. M.; CASADO, T. C.; NAKANDAKARE, E. R.; FLORIO, J. C.; SANTOS, E. Z.; GILOR, C. Therapy of canine hyperlipidemia with bezafibrate. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 717-722, 2017.

DUARTE, J.; PACHECO, M. T.; VILLAVERDE, A. B. et al. Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-Toxoplasma gondii antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, p. 047002, 2010.

FERRARI, A. C.; BACHMATIUK, A. Raman spectroscopy of graphene and related materials. In: **Graphene Science Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 1–38.

GAO, F.; XU, L.; ZHANG, Y.; YANG, Z.; HAN, L.; LIU, X. Analytical Raman spectroscopic study for discriminant analysis of different animal-derived feedstuff: understanding the high correlation between Raman spectroscopy and lipid characteristics. **Food Chemistry**, v. 240, p. 989–996, 2018.

GIANNETTO, C.; ACRI, G.; GIUDICE, E.; ARFUSO, F.; TESTAGROSSA, B.; PICCIONE, G. Quantifying serum total lipids and tryptophan concentrations by Raman spectroscopy during standardized obstacle course in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 108, p. 103820, jan. 2021.

GIANSANTE, S.; GIANA, H. E.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA JUNIOR, L. Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers in Medical Science**, v. 37, p. 287–298, 2022.

GUAITA, D.P.; GARRIGUES, DM. Infrared-based quantification of clinical parameters, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, p. 93, 2014.

KITAMURA, E. A. **Perfis hematológico, hepático, lipídico e lipoprotéico de cães (Canis familiaris) com doença hepática**. 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 10, p. 2957–2976, 2002.

KRAFFT, C.; NEUGEBAUER, U. Raman spectroscopy in biomedicine. **Journal of Biophotonics**, v. 5, n. 1–2, p. 54–76, 2012.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 100–114, 2012.

LASKOWSKA, P.; MROWKA, P.; GLODKOWSKA-MROWKA, E. Raman spectroscopy as a research and diagnostic tool in clinical hematology and hematooncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3376, 16 mar. 2024.

LI, Y.; ZHANG, X.; CHENG, J. X. Portable Raman spectroscopy for biomedical applications: current status and future prospects. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 50, n. 1, p. 10–23, 2019.

LIMA, A.M.F.; DANIEL, C.R.; PACHECO, M.T.T. et al. Discrimination of leukemias and non-leukemic cancers in blood serum samples of children and adolescents using a Raman spectral model. **Lasers in Medical Science**, v. 38, n. 1, p. 22, 2023.

LOPES, D. F.; SILVÉRIO, A.; SCHMIDT, A. K. A.; PICCA, G. B.; SILVEIRA JUNIOR, L. Characterization of biomarkers in blood serum for cancer diagnosis in dogs using Raman spectroscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 17, n. 3, e202300338, mar. 2024.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 177–186, 2006.

MATTHÄUS, C.; RÖSCH, P.; POPP, J. Raman imaging: state-of-the-art and perspectives. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 11, p. 1335–1353, 2010.

MCLAUGHLIN, G.; DOTY, K. C.; LEDNEV, I. K. Raman spectroscopy of blood for species identification. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11628–11633, 2014.

MOREIRA, L. P.; SILVEIRA JUNIOR, L.; DA SILVA, A. G.; FERNANDES, A. B.; PACHECO, M. T. T.; ROCCO, D. D. F. M. Espectroscopia de Raman aplicada para identificar metabólitos na urina de indivíduos fisicamente ativos. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 176, p. 92–99, nov. 2017.

MORI, N. *et al.* Predisposition for primary hyperlipidemia in Miniature Schnauzers and Shetland Sheepdogs as compared to other canine breeds. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 394–399, 2010.

MUNTEANU, R. M.; SCOICARU, L. O.; MILITARU, M. *et al.* Comparison of benign and malignant mammary tumors in dogs through Raman spectroscopy: two clinical cases. **Scientific Works Series C. Veterinary Medicine**, v. LXIII, n. 2, p. 85, 2017.

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.

PARKER, H. G. *et al.* Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. **Cell Reports**, v. 19, n. 4, p. 697–708, 2017.

PERTSEMLIDIS, D.; KIRCHMAN, E. H.; AHRENS JUNIOR, E. H. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 9, p. 2353–2367, set. 1973.

SATO, K.; AGOH, H.; KANESHIGE, T.; HIKASA, Y.; KAGOTA, K. Hypercholesterolemia in Shetland Sheepdogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 12, p. 1297–1301, 2000.

SHIH, W. C.; BECHTEL, K. L.; REBEC, M. V. Noninvasive glucose sensing by transcutaneous Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 5, p. 051036, maio 2015.

SILVEIRA JUNIOR, L.; BORGES, R. C. F.; NAVARRO, R. S.; GIANA, H. E.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; FERNANDES, A. B. Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 4, p. 787-795, 2017.

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman Spectroscopy: a Practical Approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2019.

STEWART, S.; PRIORE, R. J.; MATTHEW, P. N.; TRAADO, P. J. **Raman Imaging**. v. 5, p. 337–360, jul. 2012.

GIANSANTE, S., GIANA, H. E., FERNANDES, A. B., SILVEIRA, L. Jr. Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers Med Sci**. 2022 Feb;37(1):287-298.

TREVIZAN, L.; KESSLER, A. M. Lipídeos na nutrição de cães e gatos: metabolismo, fontes e uso em dietas práticas e terapêuticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 15–25, 2009.

USUI, S.; MIZOGUCHI, Y.; YASUDA, H.; ARAI, N.; KOKETSU, Y. Dog age and breeds associated with high plasma cholesterol and triglyceride concentrations. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 2, p. 269-272, 2014.

VEIGA, A. P. M. **Suscetibilidade a diabetes mellitus em cães obesos**. [tese] UFRGS, 2007. Disponível em: [<http://hdl.handle.net/10183/12709>]

VILLM, J. A.; DEMONACO, S. M.; PANCIERA, D. L.; LARSON, M. M.; BOLTON, T. A. Evaluation of gallbladder motility assessed by ultrasonography in dogs with hyperlipidemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 37, n. 3, p. 968–975, maio/jun. 2023.

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 525–534, 2010.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 12–21, jan. 2010.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Canine hyperlipidaemia. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, p. 595–605, 2015.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 24–32, 2015.

XENOULIS, P. G.; CAMMARATA, P. J.; WALZEM, R. L.; MACFARLANE, R. D.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Serum lipidome in healthy dogs of different body condition scores. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 592–598, 2010.

XENOULIS, P. G.; SUCHODOLSKI, J. S.; CAMMARATA, P. J.; WALZEM, R. L.; STEINER, J. M. Serum triglyceride and cholesterol concentrations and lipoprotein profiles in dogs with naturally occurring pancreatitis and healthy control dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 3, p. 1099–1108, 2020.