

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANELISE DANIEL RIBEIRO

**PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS VIA ESPECTROSCOPIA
RAMAN VOLTADA PARA INFLAMAÇÕES INTESTINAIS**

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

São José dos Campos, Agosto/2026

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANELISE DANIEL RIBEIRO

**PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS VIA ESPECTROSCOPIA
RAMAN VOLTADA PARA INFLAMAÇÕES INTESTINAIS**

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.

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro
Coorientadora: Prof. Dra. Pâmela Camila Pereira

São José dos Campos, Agosto/2026
UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANELISE DANIEL RIBEIRO

**PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS VIA ESPECTROSCOPIA
RAMAN VOLTADA PARA INFLAMAÇÕES INTESTINAIS**

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:

São José dos Campos, Agosto/2026

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

ANELISE DANIEL RIBEIRO

Graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Itajubá – FEPI e
Pós-Graduada em Fisioterapia Respiratória e Terapia Intensiva – FEPI.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca AMO

Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R367p

Ribeiro, Anelise Daniel

Protocolo para análise de amostras fecais via Espectroscopia Raman voltada para inflamações intestinais / Ribeiro, Anelise Daniel; Pereira, Pâmela Camila- 2026.

55; 30 cm.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos - 2026.

Bibliografia: f. 48 - 51

1. Protocolo 2. Espectroscopia Raman 3. Doença Celíaca
4. Doença de Crohn I. Ribeiro, Anelise Daniel II. Título

CDD 610.28

Biblioteca Universidade Anhembi Morumbi

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe, Denise, ao meu pai, Arildo, e à minha irmã, Ana Paula, por todo amor, apoio incondicional e presença constante em cada etapa dessa trajetória. A vocês, que sempre acreditaram em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidei, e que nunca me deixaram esquecer do quanto eu era capaz, o meu mais profundo agradecimento. Esta conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria ao longo desta caminhada, por estar presente mesmo nos momentos de incerteza, guiando meus passos, sustentando minha fé e renovando minhas forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Denise e Arildo, e à minha irmã, Ana Paula, por todo amor, apoio incondicional e por serem a base de tudo. Sou profundamente grata por cada incentivo, por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais difíceis e por me ensinarem, com tanto cuidado, o valor da persistência e da dedicação. Agradeço também pela paciência, pela compreensão nos momentos de ausência, pelas conversas e pelo apoio constante, que foram essenciais para que eu continuasse firme ao longo de toda essa trajetória.

Ao meu namorado, Gabriel Delavia, por estar ao meu lado em todos os momentos, vivenciando de perto os desafios, o estresse e as dificuldades. Obrigada por sempre me lembrar que era possível, por me encorajar quando eu duvidava e por nunca me deixar desistir.

À minha mãe, Denise, de forma especial, por ter sido essencial ao longo de toda essa caminhada. Por me lembrar constantemente das minhas prioridades e por me conduzir com sabedoria, ajudando-me a manter o foco e a clareza diante dos desafios.

Agradeço à Profa. Dra. Pâmela Camila Pereira, por sua orientação, dedicação e apoio. Obrigada por me ajudar a estruturar, planejar e conduzir este trabalho com organização, tranquilidade e busca constante pela excelência.

Ao Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, pela orientação, incentivo e por constantemente me desafiar a ir além. Agradeço por compartilhar seus conhecimentos de forma tão vasta, contribuindo significativamente para o meu crescimento acadêmico, além de estimular meu desenvolvimento por meio de propostas exigentes e fundamentais para minha formação. Destaco também sua dedicação e comprometimento na condução do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

À minha amiga, mestra e excelente pesquisadora Letícia Cristine de Siqueira Santos, e à Dra. Milene da Silva Melo, pela colaboração essencial no desenvolvimento

desta pesquisa. Sou grata por toda disponibilidade, pelas trocas enriquecedoras e por contribuírem ativamente com análises e soluções ao longo do processo.

Aos meus amigos Sarah Santana, Raissa Monteiro, Jessica Sthefanny Carvalho e Gustavo Veloso, pelo apoio, companheirismo e por tornarem essa trajetória mais leve.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio concedido por meio da bolsa de Mestrado, fundamental para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Doença Celíaca (DC) e a Doença de Crohn (DCh) são doenças inflamatórias crônicas que, embora sujeitas a mecanismos desencadeantes distintos, compartilham alterações na barreira intestinal, na resposta imunológica, na interação com a microbiota e no equilíbrio metabólico intestinal. Essas alterações podem modificar o perfil bioquímico do conteúdo intestinal e, conseqüentemente, das fezes. Nesse contexto, a análise de amostras fecais destaca-se como estratégia não invasiva para investigação de alterações bioquímicas intestinais. A Espectroscopia Raman (ER) surge como ferramenta promissora para identificar alterações moleculares em amostras fecais e investigar diferenças entre indivíduos saudáveis e aqueles acometidos por DC ou DCh. O estudo teve como objetivo desenvolver e padronizar um protocolo de preparo de amostras fecais para análise por ER e avaliar diferenças espectrais entre indivíduos saudáveis, pacientes com DC e pacientes com DCh. Trata-se de um estudo de caráter metodológico e exploratório, com delineamento transversal, composto por 15 voluntárias, distribuídas em Grupo Saudável (GS, n=9), Grupo Celíacas (GDC, n=4) e Grupo Doença de Crohn (GDCh, n=2). As amostras fecais foram submetidas a processos padronizados de diluição, homogeneização e centrifugação, seguidos de análise por ER dispersiva utilizando laser com comprimento de onda em 830 nm. Os resultados demonstraram que o protocolo desenvolvido possibilitou a obtenção de espectros reprodutíveis, destacando-se a região de 1046–1048 cm^{-1} , devido a sua maior contribuição nos grupos patológicos. Esses achados reforçam o potencial desse estudo para caracterizar alterações bioquímicas fecais. Apesar das limitações relacionadas ao reduzido número amostral e à complexidade da matriz fecal, os resultados indicam que a ER apresenta potencial como ferramenta não invasiva para investigação de alterações associadas à DC e DCh.

Palavras-chave: Protocolo; Espectroscopia Raman; Doença Celíaca; Doença de Crohn; Microbiota intestinal; Biomarcadores; Engenharia Biomédica.

ABSTRACT

Celiac Disease (CeD) and Crohn's Disease (CrD) are chronic inflammatory diseases that, although subject to distinct triggering mechanisms, share alterations in the intestinal barrier, immune response, interaction with the microbiota, and intestinal metabolic balance. These alterations may modify the biochemical profile of the intestinal contents and, consequently, of feces. In this context, fecal sample analysis stands out as a non-invasive strategy for investigating intestinal biochemical alterations. Raman Spectroscopy (RS) has emerged as a promising tool for identifying molecular alterations in fecal samples and investigating differences between healthy individuals and those affected by CeD or CrD. This study aimed to develop and standardize a fecal sample preparation protocol for RS analysis and to evaluate spectral differences among healthy individuals, patients with CeD, and patients with CrD. This was a methodological and exploratory study with a cross-sectional design, comprising 15 female volunteers distributed into a Healthy Group (HG, n=9), Celiac Disease Group (CeDG, n=4), and Crohn's Disease Group (CrDG, n=2). Fecal samples underwent standardized dilution, homogenization, and centrifugation procedures, followed by analysis using dispersive RS with an 830 nm laser. The results demonstrated that the developed protocol enabled the acquisition of reproducible spectra, with the 1046–1048 cm^{-1} region standing out due to its greater contribution in the pathological groups. These findings reinforce the potential of this study for characterizing fecal biochemical alterations. Despite limitations related to the small sample size and the complexity of the fecal matrix, the results indicate that RS has potential as a non-invasive tool for investigating alterations associated with CeD and CrD.

Keywords: Protocol; Raman Spectroscopy; Celiac Disease; Crohn's Disease; Intestinal Microbiota; Biomarkers; Biomedical Engineering.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
4.1 Microbiota Intestinal e Homeostase.....	21
4.2 Aspectos fisiopatológicos da DC e a DCh.....	24
4.3 Espectroscopia Raman (ER).....	26
5. METODOLOGIA.....	29
5.1 Tipo de Estudo	29
5.2 Aspectos Éticos.....	29
5.3 Critérios de Inclusão.....	29
5.4 Critérios de Exclusão.....	29
5.5 Amostra do estudo.....	29
5.6 Riscos e Benefícios	31
5.7 Obtenção e preservação da amostra.....	31
5.8 Ensaios experimentais para a padronização do protocolo.....	32
5.9 Protocolo de preparo de amostras fecais para análise Raman.....	32
5.10 Análise dos Dados.....	34
5.11 Avaliação da repetibilidade do protocolo Raman.....	35
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Padronização e definição do protocolo Raman.....	35
6.1.1 Definição dos parâmetros ópticos.....	35
6.1.2 Avaliação das condições de diluição.....	36
6.1.3 Parâmetros de centrifugação.....	36

6.1.4 Definição do porta-amostra.....	37
6.2 Análise espectral das amostras fecais.....	37
6.3 Análise exploratória por PCA.....	41
7. DISCUSSÃO.....	41
8. CONCLUSÃO.....	46
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	47
10. REFERÊNCIAS.....	48
11. ANEXO 1.....	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática dos processos de espalhamento Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes observados no efeito Raman.....	27
Figura 2	Fluxograma de CONSORT.....	30
Figura 3	Separação das fases da amostra fecal após o protocolo de centrifugação.....	33
Figura 4	Fluxograma do processo de aquisição dos espectros Raman das amostras fecais.....	34
Figura 5	Definição da potência do laser e tempo de exposição.....	36
Figura 6	Influência da diluição da amostra na qualidade dos espectros.....	36
Figura 7	Sinal Raman referente as três fases de centrifugação.....	37
Figura 8	Espectros dos grupos GS, GDC e GDCh.....	38
Figura 9	Plotagem dos 5 primeiros PCs referentes às amostras fecais.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização clínica das participantes dos grupos GC e GDCh.....	30
Tabela 2	Monitoramento da atividade intestinal condição patológica.....	54
Tabela 3	Monitoramento da atividade intestinal condição patológica.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
Anti-Stokes	Espalhamento Raman Anti-Stokes
ATP	Adenosina Trifosfato
CCR	Câncer Colorretal
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Corpo de Fundo
DC	Doença Celíaca
DCh	Doença de Crohn
DCs	Células Dendríticas
DF	Dispepsia Funcional
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ER	Espectroscopia Raman
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GC	Grupo Celíacas
GDCh	Grupo Doença de Crohn
GI	Gastrointestinal

GS	Grupo Saudável
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
IECs	Células Epiteliais Intestinais
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
INT	Intermediária
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Microrganismos
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD-like
NLRC4	CARD Domain Containing Protein 4
NOD	Receptores do tipo domínio de Oligomerização de Ligação a Nucleotídeos
NO	Óxido Nítrico
NO ₃ ⁻	Nitrato
PCA	Análise de Componentes Principais
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PSA	Polissacarídeo A
rRNA	RNA Ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico

rpm	Rotações por minuto
SII	Síndrome do Intestino Irritável
SERS	Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície
SN	Sobrenadante
Stokes	Espalhamento Raman Stokes
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TLRs	Receptores Toll-like
Tregs	Células T reguladoras
UAM	Universidade Anhembi Morumbi

LISTA DE SIMBOLOS

cm^{-1}	Centímetros inversos
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
$\times$	Multiplicação
$<$	Menor que
$>$	Maior que
$\leq$	Menor ou igual a
$\geq$	Maior ou igual a
$\mu\text{g/g}$	Microgramas por grama
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
n	Número amostral
nm	Nanometro
p	Valor de significância estatística
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
$\sim$	Aproximadamente

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é composta por um conjunto complexo de bactérias, vírus, fungos e arqueas, que desempenham um papel essencial na manutenção da saúde gastrointestinal (GI) e do bem-estar geral. Esses microrganismos participam de funções vitais em humanos, como a digestão, o metabolismo e a regulação do sistema imunológico, além de contribuírem para processos neuroendócrinos fundamentais ao equilíbrio físico e mental. No decorrer da fermentação de componentes alimentares não digeridos, a microbiota produz compostos bioativos, especialmente os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs), como o acetato, o propionato e o butirato. Esses metabólitos fornecem energia às células do cólon, modulam respostas inflamatórias e aumentam a integridade da barreira intestinal. Além disso, a microbiota intestinal é responsável pela síntese de vitaminas essenciais, como as do complexo B e a vitamina K, que colaboram para a manutenção da saúde geral (KRYNICKA *et al.*, 2025).

A integridade da barreira intestinal é modulada pela microbiota intestinal por meio da produção de muco e o fortalecimento das junções estruturais e funcionais entre as células epiteliais. Alterações em sua composição ou atividade, conhecidas como disbiose, estão associadas a diversos distúrbios GI, como Síndrome do Intestino Irritável (SII), Doença Inflamatória Intestinal (DII) como a Doença de Crohn (DCh) e a Retocolite Ulcerativa (RU), Doença Celíaca (DC), Dispepsia Funcional (DF) e Câncer Colorretal (CCR), além de condições sistêmicas, incluindo obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). A disbiose também interfere na comunicação do eixo intestino-cérebro, mediada por metabólitos microbianos, como os derivados do triptofano, afetando a saúde neurológica e psicológica (KRYNICKA *et al.*, 2025).

A metabolômica é uma abordagem da biologia de sistemas voltada para a análise qualitativa e quantitativa de pequenas moléculas presentes em amostras biológicas. Tradicionalmente, os principais espécimes utilizados em estudos metabolômicos humanos são o soro, a urina e os tecidos. Entretanto, as amostras fecais têm se destacado como uma alternativa valiosa por serem obtidas de forma não invasiva e refletirem, de maneira abrangente, as interações metabólicas entre o hospedeiro e a microbiota intestinal. As fezes humanas constituem uma matriz bioquímica complexa, composta por uma ampla variedade de substâncias que incluem metabólitos endógenos, produtos microbianos e compostos xenobióticos.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento do microbioma, a integração de análises ômicas aplicadas ao material fecal tem ganhado destaque como uma estratégia promissora e não invasiva para investigar as relações dinâmicas entre a microbiota intestinal humana e o indivíduo (FORNASARO *et al.*, 2022).

A forma mais comum de caracterizar a microbiota intestinal ainda se baseia na análise do RNA ribossômico 16S bacteriano (rRNA) extraído de amostras fecais. Contudo, esse método é relativamente caro, trabalhoso e sensível a fatores que afetam a estabilidade do RNA, o que pode resultar em variabilidade significativa na composição microbiana identificada. Além disso, técnicas acopladas de cromatografia de alta eficiência com Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS), vêm sendo utilizadas para o estudo da metabolômica fecal, por oferecerem elevada seletividade, sensibilidade e capacidade de fornecer informações estruturais e quantitativas simultaneamente. No entanto, a obtenção de dados quantitativos requer o uso de padrões de calibração específicos, custo elevado, tempo de análise prolongado e a necessidade de profissionais especializados, que limitam sua aplicabilidade em contextos clínicos de rotina (FORNASARO *et al.*, 2022).

Diante dessas limitações, cresce o interesse por métodos alternativos que permitam análises rápidas, não destrutivas e com menor custo operacional. Nesse contexto, a Espectroscopia Raman (ER) destaca-se por basear-se no fenômeno de espalhamento inelástico da luz, no qual a interação entre uma molécula e uma fonte de laser monocromática provoca uma troca de energia vibracional em nível quântico. Essa interação promove um deslocamento de frequência entre a radiação incidente e a espalhada, originando um espectro vibracional característico. Tal espectro fornece informações detalhadas sobre as ligações químicas e a simetria molecular de uma substância específica, possibilitando a caracterização de componentes biológicos complexos (ACRI *et al.*, 2020).

A ER tem se destacado como uma técnica versátil e poderosa na análise de sistemas biológicos. Inicialmente utilizada para investigar alterações estruturais em proteínas e identificar assinaturas espectrais de diferentes biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos, a técnica evoluiu para aplicações clínicas relevantes. Nos últimos anos, tem sido empregada no diagnóstico de diversas doenças, incluindo câncer, infecções, condições neurodegenerativas e DII, por detectar alterações bioquímicas sutis que antecedem mudanças visíveis nos tecidos (ACRI *et al.*, 2020).

Dessa forma, a ER se apresenta como uma ferramenta em potencial para detectar indicadores de doenças relacionados à saúde GI, permitindo a análise química detalhada de amostras biológicas fecais. Essa técnica possibilita identificar alterações metabólicas e composicionais na microbiota intestinal, incluindo a detecção de metabólitos como AGCCs, lipídios e proteínas, associados a condições como DII e CCR. Além de identificar marcadores específicos de doença, como variações em ácidos biliares, compostos fenólicos e aminas biogênicas, a ER oferece um meio não invasivo e preciso para monitorar a atividade microbiana e o estado de saúde intestinal (KRYNICKA *et al.*, 2025).

A DC e a DCh, embora apresentem etiologias distintas, compartilham importantes mecanismos fisiopatológicos relacionados à inflamação crônica do trato GI. Ambas são caracterizadas por disfunção da barreira intestinal, aumento da permeabilidade epitelial, ativação exacerbada da resposta imune e alterações na composição da microbiota intestinal relacionadas a disbiose, fatores que contribuem para modificações no ambiente intestinal e em seu perfil metabólico (PASCUAL *et al.*, 2014). Essas alterações repercutem na composição bioquímica das fezes, tornando essa matriz biológica uma fonte promissora para a identificação de biomarcadores não invasivos. Nesse contexto, a utilização da DC e da DCh como modelos de investigação possibilitam avaliar o potencial da ER na detecção de alterações moleculares associadas ao processo inflamatório intestinal e na identificação de biomarcadores fecais com potencial aplicação diagnóstica.

A consolidação de protocolos espectroscópicos aplicáveis à análise fecal poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias menos invasivas e mais ágeis na avaliação de alterações bioquímicas associadas à DC e a DCh além de ampliar as possibilidades de acompanhamento longitudinal dessas condições. Assim, este estudo justifica-se pela necessidade de padronizar e investigar a aplicação da ER em amostras fecais, buscando ampliar o conhecimento sobre seu potencial como ferramenta complementar na avaliação não invasiva das alterações bioquímicas relacionadas à inflamação intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar um protocolo de preparo de amostras fecais para análise por ER e avaliar preliminarmente diferenças espectrais entre indivíduos saudáveis, pacientes com DC e pacientes com DCh.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições experimentais ideais para análise das amostras.
- Determinar os parâmetros ópticos adequados para a aquisição dos espectros.
- Determinar a diluição adequada das amostras fecais.
- Estabelecer as condições adequadas de centrifugação das amostras.
- Caracterizar os perfis espectrais dos diferentes grupos de estudo.
- Avaliar a aplicabilidade do protocolo de ER e sua capacidade de diferenciar os grupos estudados.

3. JUSTIFICATIVA

Embora existam métodos diagnósticos consolidados para a DC e a DCh, muitos ainda são invasivos, onerosos e apresentam limitações para detectar precocemente alterações bioquímicas e metabólicas associadas ao processo inflamatório intestinal (KRYNICKA *et al.*, 2025). Nesse cenário, a análise de amostras fecais destaca-se como uma abordagem não invasiva e representativa das interações entre o hospedeiro e a microbiota intestinal. A ER surge como uma alternativa promissora por permitir a caracterização bioquímica rápida, não destrutiva e livre de marcadores. Apesar desse potencial, sua aplicação na análise de amostras fecais ainda permanece pouco explorada (ACRI *et al.*, 2020).

A consolidação de protocolos espectroscópicos aplicáveis à análise fecal poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias menos invasivas e mais ágeis na avaliação de alterações bioquímicas associadas à DC e a DCh além de ampliar as possibilidades de acompanhamento longitudinal dessas condições.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Microbiota Intestinal e Homeostase

A microbiota intestinal desempenha papel essencial na manutenção da saúde e no desenvolvimento de diversas doenças, estabelecendo interações mutualísticas fundamentais para a homeostase intestinal, o metabolismo e a regulação imunológica.

Sua composição e diversidade são influenciadas por fatores como alimentação, idade, estilo de vida e condições ambientais, sendo a dieta considerada um dos principais moduladores desse ecossistema intestinal (SIMÕES; MAGANINHO; SOUSA, 2022). Alterações ambientais, como dietas ocidentais ricas em gordura e pobres em fibras, além do uso frequente de antibióticos, podem comprometer o equilíbrio da microbiota intestinal e aumentar a suscetibilidade a doenças inflamatórias imunomediadas, incluindo a DC, DCh, asma, obesidade e Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) (MANN; LAM; UHLIG, 2024).

Atualmente, o entendimento sobre a composição de uma microbiota intestinal considerada saudável deriva de diversos estudos conduzidos em indivíduos sem sinais clínicos evidentes de doenças (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Esses estudos demonstram que os filos bacterianos predominantes nas fezes humanas são *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enquanto *Proteobacteria* e *Actinobacteria* encontram-se presentes em menores proporções, embora de maneira consistente na maioria dos indivíduos. A manutenção desse equilíbrio microbiano é fundamental para a homeostase intestinal e para o adequado funcionamento metabólico e imunológico do hospedeiro.

Além de contribuir para a regulação do apetite e do aproveitamento energético, os microrganismos intestinais produzem metabólitos essenciais para a manutenção da homeostase intestinal. Entre eles, destacam-se os AGCCs, especialmente o butirato, que atua como fonte de energia para enterócitos e hepatócitos, além de participar da modulação imunológica e da preservação da barreira intestinal. A redução desses metabólitos está associada a processos inflamatórios, alergias e alterações na composição da microbiota intestinal (MANN; LAM; UHLIG, 2024). Ademais, a microbiota intestinal participa do metabolismo xenobiótico ao modificar componentes químicos da dieta, medicamentos, poluentes e pesticidas, influenciando diretamente os efeitos dessas substâncias no organismo (NAKOV; VELIKOVA, 2020).

Compostos nitrogenados derivados da dieta e do metabolismo microbiano, como aminoácidos, nitratos, amônia e ureia, exercem influência sobre a homeostase intestinal ao servirem de substrato para bactérias intestinais e modularem suas atividades metabólicas. Entretanto, o excesso desses compostos pode favorecer a produção de metabólitos potencialmente prejudiciais, capazes de comprometer o metabolismo energético dos colonócitos, células epiteliais responsáveis pelo revestimento do cólon e pela manutenção da barreira intestinal, reduzindo a produção

de Adenosina Trifosfato (ATP) e prejudicando a integridade epitelial. Além disso, subprodutos nitrogenados podem estimular a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e nitrogênio, contribuindo para estresse oxidativo, aumento da permeabilidade intestinal e desequilíbrios inflamatórios na mucosa intestinal (HERRERA; BYERLEY, 2025).

A homeostase intestinal depende da interação equilibrada entre a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro, mediada principalmente pela comunicação entre microrganismos comensais e células epiteliais intestinais (IECs). Esse processo inicia-se pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados aos Microrganismos (MAMPs) por Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), como os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores do tipo Domínio de Oligomerização de Ligação a Nucleotídeos (NOD), presentes nas IECs e em células dendríticas. A ativação desses receptores estimula a produção de peptídeos antimicrobianos e citocinas reguladoras, favorecendo a diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e a manutenção da tolerância imunológica, fundamentais para o controle da inflamação intestinal (MARANDUBA et al., 2015; THAISS et al., 2016).

Além de desencadear mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos, os PRRs também desempenham papel importante na preservação da eubiose intestinal. A ativação dos TLRs por componentes bacterianos regula vias inflamatórias, enquanto determinadas moléculas produzidas pela microbiota, como o polissacarídeo A de *Bacteroides fragilis*, contribuem para a modulação da resposta imune e para o fortalecimento da tolerância imunológica (AL-RASHIDI, 2022). Outro mecanismo relevante envolve a ativação do inflamassoma mediado pela proteína NLRC4, que favorece a eliminação de células epiteliais infectadas e auxilia na proteção da mucosa intestinal (THAISS et al., 2016).

A colonização microbiana nos primeiros momentos de vida também exerce influência sobre o desenvolvimento do sistema imunológico. Evidências experimentais indicam que a microbiota adquirida durante o parto participa da maturação da resposta imune intestinal, contribuindo para o estabelecimento da tolerância imunológica e da homeostase. Alterações nesse processo inicial podem favorecer respostas inflamatórias desreguladas e aumentar a susceptibilidade a doenças ao longo da vida (JAŠAREVIĆ; BALE, 2019; LOTZ et al., 2000).

A aplicação de técnicas espectroscópicas na investigação das doenças GI tem demonstrado grande potencial para identificação de alterações metabólicas

associadas à microbiota intestinal. Marchesi et al. (2007), utilizando ER associada à análise multivariada, observaram diferenças significativas nos perfis metabólicos fecais de pacientes com DCh e RU, incluindo redução de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, como butirato e acetato, além de aumento de aminoácidos fecais relacionados ao processo inflamatório intestinal. Esses achados reforçam a relevância das técnicas espectroscópicas na detecção não invasiva de biomarcadores moleculares associados ao contexto de disbiose, corroborando o potencial da ER na identificação de alterações bioquímicas presentes em amostras fecais e na investigação do metabolismo intestinal.

Um estudo realizado utilizando ER investigou a caracterização molecular de tecidos intestinais de indivíduos saudáveis, pacientes com DCh e RU por meio de análises *in vivo* durante procedimentos de colonoscopia. Os autores observaram diferenças relevantes na intensidade e no perfil das bandas Raman relacionadas principalmente a proteínas e lipídios do tecido intestinal, incluindo alterações nas bandas Amida I ($\sim 1658\text{ cm}^{-1}$) e Amida III ($\sim 1240\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$), associadas à estrutura proteica, além de bandas lipídicas entre $\sim 1300\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$. Os tecidos inflamados apresentaram aumento relativo de sinais proteicos, alterações em componentes lipídicos e maior heterogeneidade espectral quando comparados aos tecidos saudáveis, sugerindo modificações bioquímicas decorrentes do processo inflamatório intestinal. Além disso, a metodologia permitiu discriminar os grupos avaliados, pacientes com DCh e pacientes com RU com elevada acurácia diagnóstica, demonstrando o potencial da ER como ferramenta objetiva e minimamente invasiva para identificação de alterações moleculares associadas às DII (PENCE *et al.*, 2017).

4.2 Aspectos fisiopatológicos da DC e a DCh

A DC é uma enteropatia crônica imunomediada desencadeada pela ingestão de glúten em indivíduos geneticamente suscetíveis, caracterizada por uma resposta imunológica anormal que promove inflamação da mucosa do intestino delgado e comprometimento da absorção de nutrientes. Estima-se que acometa aproximadamente 1% da população mundial, embora muitos casos permaneçam subdiagnosticados devido à ampla variabilidade de suas manifestações clínicas, que podem variar desde quadros clássicos de má absorção até formas oligossintomáticas ou assintomáticas. A doença desenvolve-se pela interação entre predisposição genética, principalmente associada aos haplótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, fatores

ambientais e mecanismos imunológicos desencadeados pela exposição ao glúten, resultando em atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas e infiltração linfocitária da mucosa intestinal (LEBWOHL; SANDERS; GREEN, 2018).

Além da predisposição genética e da exposição ao glúten, evidências demonstram que a microbiota intestinal exerce papel importante na fisiopatologia da DC, influenciando a resposta imunológica da mucosa intestinal. A disbiose pode comprometer a integridade da barreira epitelial, aumentando a permeabilidade intestinal e favorecendo a passagem de peptídeos do glúten para a lâmina própria, onde desencadeiam uma resposta inflamatória exacerbada. Nesse contexto, observa-se aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente da interleucina-15 (IL-15), considerada um dos principais mediadores da doença por promover a ativação de linfócitos intraepiteliais citotóxicos e contribuir para o dano epitelial. Além disso, citocinas como interleucina-21 (IL-21) e interferon-gama (IFN- γ) participam da amplificação da resposta imune adaptativa e da manutenção da inflamação crônica da mucosa intestinal (VERDU; GALIPEAU; JABRI, 2015).

Entretanto a DCh é uma DII crônica, progressiva e recidivante, caracterizada por inflamação transmural que pode acometer qualquer segmento do trato GI, com maior frequência no íleo terminal e cólon. A inflamação persistente favorece alterações estruturais irreversíveis, como estenoses, fístulas e abscessos, contribuindo para a progressão da doença, recorrência dos sintomas e aumento da necessidade de intervenções cirúrgicas ao longo da evolução clínica (TIAN; RANASINGHE; HSU, 2025). Sua etiologia é multifatorial, envolvendo a interação entre predisposição genética, fatores ambientais, alterações da microbiota intestinal e desregulação imunológica (RODA *et al.*, 2020).

A imunopatogênese da DCh envolve a ativação da imunidade inata e adaptativa, com predominância das respostas mediadas por linfócitos T auxiliares Th1 e Th17. Citocinas como IL-12, IL-18, IL-23, IL-15 e IL-21 participam da diferenciação, expansão e manutenção dessas populações celulares, enquanto IFN- γ , TNF- α e IL-17 contribuem para o recrutamento de células inflamatórias e perpetuação da inflamação intestinal. De forma semelhante à DC, a DCh apresenta perda da homeostase imunológica intestinal, com participação de fatores genéticos, alterações da microbiota e resposta inflamatória exacerbada frente a estímulos luminiais. Entretanto, enquanto a DC está associada principalmente à resposta imunomediada

contra componentes do glúten em indivíduos geneticamente predispostos, a DC apresenta uma resposta inflamatória mais ampla e não restrita a um único antígeno, podendo envolver múltiplos fatores ambientais e imunológicos (DE SOUZA *et al.*, 2016).

A relação entre a DC e a DCh tem sido investigada devido à ocorrência de manifestações clínicas semelhantes e à presença de fatores de suscetibilidade compartilhados. Estudos apontam uma sobreposição entre essas condições, especialmente no que se refere à alteração da permeabilidade intestinal, comprometimento da barreira mucosa e participação de vias imunológicas comuns, embora sejam desencadeadas por estímulos antigênicos distintos. Além disso, a coexistência dessas doenças descrita na literatura reforça a hipótese de que mecanismos relacionados à predisposição genética e à interação entre hospedeiro e ambiente podem contribuir para o desenvolvimento de fenótipos inflamatórios semelhantes (IEZZI *et al.*, 2012). Dessa forma, apesar das diferenças nos agentes desencadeadores, ambas apresentam alterações intestinais capazes de promover modificações no microambiente gastrointestinal, incluindo mudanças na composição da microbiota e no perfil molecular das amostras biológicas, aspectos relevantes para a investigação de potenciais biomarcadores (PASCUAL *et al.*, 2014).

4.3 Espectroscopia Raman (ER)

O efeito Raman fundamenta-se na interação entre fótons provenientes de uma fonte luminosa e as moléculas presentes em uma amostra, promovendo o espalhamento inelástico da luz (LONG, 2002; RAMAN; KRISHNAN, 1928). Esse fenômeno pode ser classificado em três formas principais de espalhamento energético: Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes, conforme ilustrado na Figura 1.

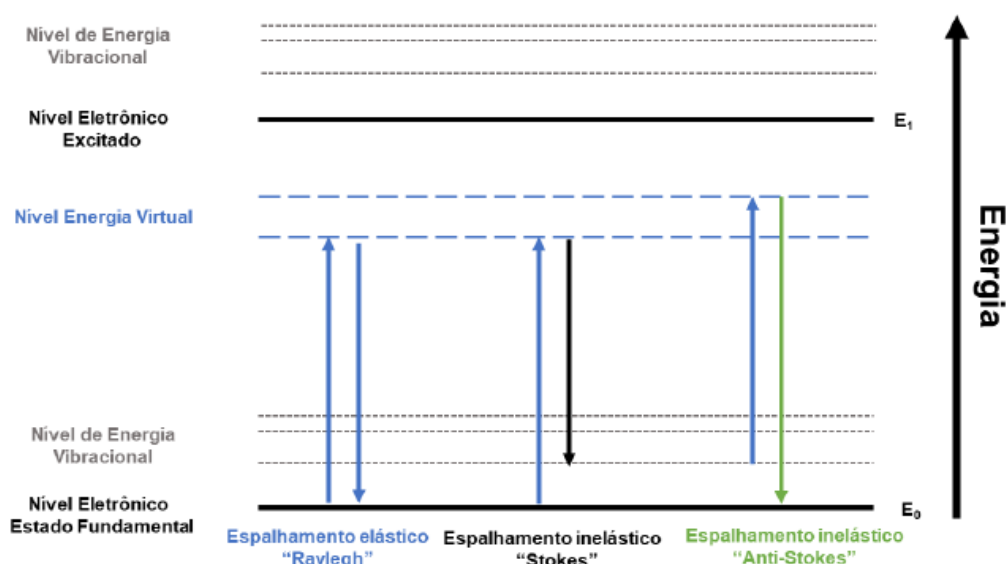


Figura 1: Representação esquemática dos processos de espalhamento Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes observados no efeito Raman

O espalhamento Rayleigh caracteriza-se como um processo elástico, no qual os fótons espalhados mantêm a energia dos fótons incidentes. Em contrapartida, os espalhamentos Stokes e Anti-Stokes correspondem ao efeito Raman propriamente dito, envolvendo alterações nos níveis energéticos moleculares. O espalhamento Stokes ocorre quando os fótons incidentes transferem parte de sua energia para a amostra durante a interação, originando fótons dispersos com menor energia em relação aos fótons iniciais. Essa diferença energética está associada aos modos vibracionais das moléculas, fazendo com que as bandas de Stokes sejam observadas em frequências inferiores à frequência de excitação. Dessa forma, essas bandas fornecem informações relevantes acerca dos modos vibracionais do estado fundamental molecular (RAMAN; KRISHNAN, 1928; EMBER *et al.*, 2017).

Já o espalhamento Anti-Stokes acontece quando os fótons incidentes recebem energia da amostra durante a interação, resultando em fótons dispersos com energia superior à dos fótons incidentes. Esse processo está relacionado a transições vibracionais de maior energia nas moléculas, o que faz com que as linhas Anti-Stokes apareçam em frequências acima da frequência de excitação. Além disso, a intensidade desse tipo de espalhamento costuma ser inferior à observada nas linhas de Stokes, devido à menor probabilidade de ocorrência de transições para estados vibracionais mais energéticos (KAUFFMANN; KOKANYAN; FONTANA, 2019; GERALDES, 2020; LIU *et al.*, 2022).

A radiação Raman espalhada é detectada por um espectrômetro permitindo a obtenção de informações relacionadas à composição molecular da amostra. A técnica apresenta diversas aplicações na caracterização de células, tecidos e outros materiais biológicos (ALLAKHVERDIEV et al., 2022). Além disso, a ER apresenta potencial para aplicações clínicas *in vivo*, incluindo a avaliação de tecidos e o diagnóstico de doenças em tempo real (HANLON et al., 2000).

No contexto biomédico, a seleção do comprimento de onda de excitação constitui um importante parâmetro da instrumentação Raman, em particular, a utilização de fontes no infravermelho próximo, como 785 e 830 nm, é frequente em análises biomédicas devido a sua menor fluorescência (PENCE; MAHADEVAN-JANSEN, 2016).

O preparo da amostra representa uma etapa crítica para a obtenção de espectros Raman reprodutíveis e com adequada relação sinal-ruído, especialmente em matrizes biológicas complexas, como amostras fecais. Fatores como concentração da amostra, presença de água, material particulado, compostos fluorescentes e heterogeneidade química podem interferir significativamente na qualidade espectral e na interpretação dos resultados. Em análises biológicas, procedimentos de homogeneização, diluição e centrifugação são frequentemente utilizados para reduzir interferências ópticas e melhorar a distribuição dos analitos na amostra. A homogeneização favorece maior uniformidade molecular, reduzindo variações locais relacionadas à heterogeneidade do material biológico. Já a diluição auxilia na diminuição da turbidez e da absorção óptica excessiva, embora diluições muito elevadas possam reduzir a intensidade do sinal Raman devido à diminuição da concentração dos compostos de interesse (DAS; AGRAWAL, 2011).

Além do preparo da amostra, a aquisição espectral depende de parâmetros instrumentais que influenciam a intensidade e a relação sinal-ruído dos espectros Raman. Entre eles, destacam-se a potência do laser, o tempo de aquisição e o número de acumulações, cuja definição deve considerar as características da amostra e o objetivo da análise. Em amostras biológicas, a fluorescência de fundo constitui uma das principais limitações à obtenção de espectros com adequada relação sinal-ruído, tornando necessária a otimização das condições de aquisição (QI et al., 2024). Além disso, o material utilizado como porta-amostra pode contribuir para o sinal de fundo e interferir na análise espectral, sendo recomendável a utilização de superfícies com baixa interferência Raman e boa uniformidade (QI et al., 2024).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo de caráter metodológico e exploratório, com delineamento transversal, voltado à padronização analítica de amostras fecais humanas para análise de biomarcadores GI associados à microbiota intestinal por meio da ER.

5.2 Aspectos Éticos

Pesquisa realizada mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Os dados foram coletados somente após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Anhembi Morumbi (UAM), sob o parecer nº 91209025.8.0000.5492/2025, registrado na Plataforma Brasil, e foram utilizados unicamente para fins da pesquisa, sem a menção dos nomes das voluntárias para garantir o sigilo dos participantes.

5.3 Critérios de Inclusão

Participantes do sexo feminino com idade entre 20 e 60 anos, que assinaram o TCLE, portadoras de DC, portadoras de DCh e mulheres saudáveis.

5.4 Critérios de Exclusão

Mulheres com diagnóstico de doenças hematológicas, com histórico de transfusão sanguínea nos últimos três meses, gestação ou lactação, bem como condições crônicas descompensadas, como insuficiência hepática grave ou insuficiência renal em estágio avançado, que fazem uso de antibióticos, probióticos ou medicamentos capazes de interferir significativamente na microbiota intestinal de além daquelas submetidas a colecistectomia. Também foram excluídas as participantes com histórico de doenças do trato GI distintas das avaliadas no estudo.

5.5 Amostra do Estudo

O grupo amostral avaliado neste estudo é representado por 15 voluntárias do sexo feminino, selecionadas a partir de um questionário online preenchido para a inscrição prévia das participantes. A figura 2, apresenta de forma completa o grupo amostral. As voluntárias foram divididas em três subgrupos, Grupo Saudável (GS)

n=9, Grupo Celíacas (GC) n=4 e Grupo Doença de Crohn (GDCh) com n=2 representadas na tabela 1.

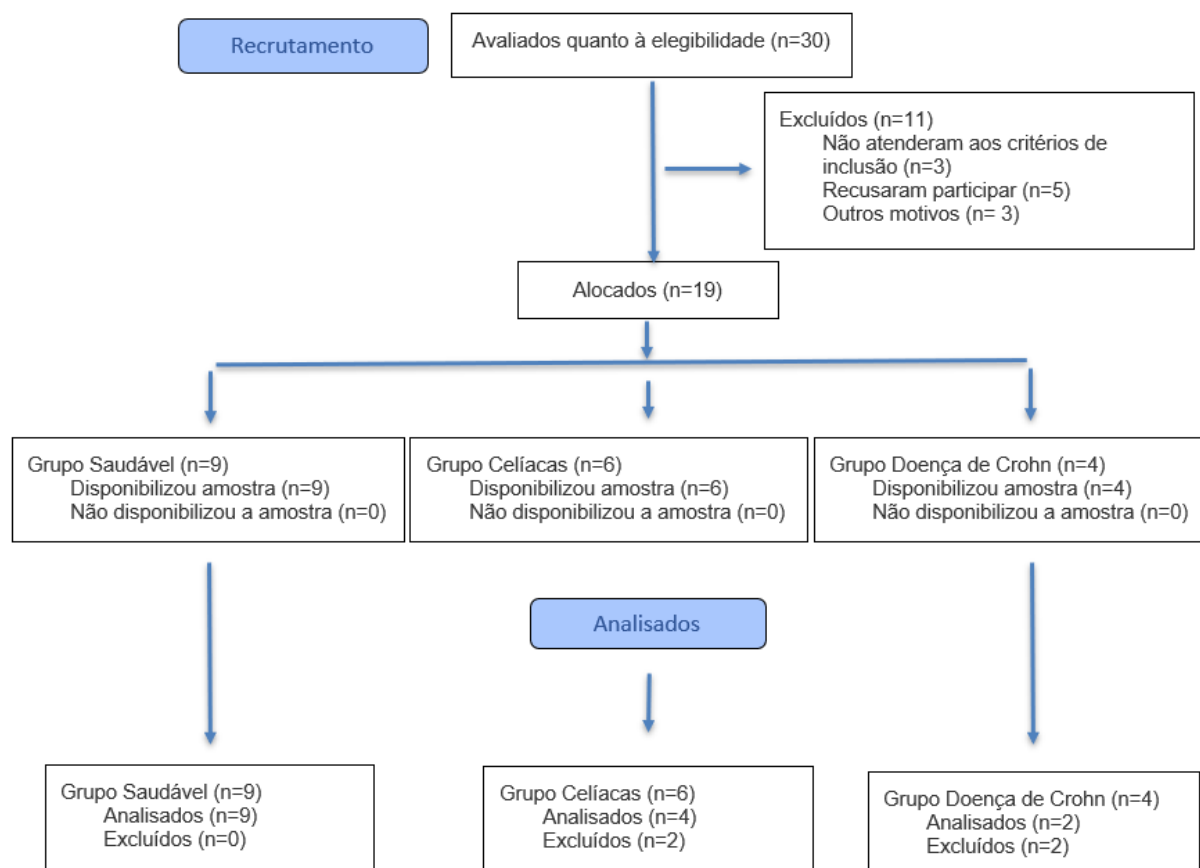


Figura 2: Fluxograma de CONSORT.

Durante a etapa de análise, quatro voluntárias foram excluídas, sendo duas do grupo DC e duas do grupo DCh. Essa ação foi necessária devido à insuficiência do volume da amostra na fase intermediária após a centrifugação, impossibilitando a coleta para aquisição espectral. Tal condição se deu devido a presença de diarreia e elevada frequência evacuatória, que influenciaram as características da matriz fecal.

Tabela 1 – Caracterização clínica das participantes dos grupos GC e GDCh.

Variável Clínica	Descrição
Tempo de diagnóstico	Acima de 2 anos
Atividade da doença	Ativa
Medicações em uso	Imunobiológicos (Infliximabe – Anti TNF) em DCh.
Colonoscopia recente	Sim
Estado clínico atual	Sintomático
Internações prévias	Sim (últimos 3 meses)
Presença de sintomas GI	Dor abdominal, diarreia, constipação e flatulência.
Escala de Bristol	Tipo 1-5
Hábitos alimentares	Dieta livre monitorada.

5.6 Riscos e Benefícios

A participação neste estudo apresenta risco mínimo, uma vez que envolve exclusivamente a coleta de amostras fecais, caracterizando-se como um procedimento não invasivo. Os possíveis desconfortos estão relacionados principalmente a eventuais constrangimentos durante a coleta do material e ao seu manuseio pelo participante. Adicionalmente, pode ocorrer de forma pontual, leve alteração do hábito intestinal, como constipação ou dificuldade na evacuação, possivelmente associada à ansiedade no momento da coleta, sem riscos físicos diretos associados ao procedimento.

As orientações referentes à coleta, ao armazenamento e ao transporte das amostras são fornecidas de forma clara e detalhada, seguindo padrões de segurança e biossegurança, com o objetivo de garantir a integridade da amostra, bem como a segurança, privacidade e conforto do participante durante todo o processo.

Em relação aos benefícios, não há garantia de benefício direto ao participante, no entanto, sua participação contribui para o avanço do conhecimento científico, especialmente no desenvolvimento de protocolos para análise de amostras fecais por ER e na identificação de possíveis biomarcadores associados a DC e DCh, protocolos estes que não estão disponíveis na literatura científica. Adicionalmente, o participante obtém de forma indireta, uma avaliação exploratória do perfil espectral fecal, sem finalidade diagnóstica.

5.7 Obtenção e Preservação da Amostra

Previamente à coleta da amostra fecal, os participantes realizaram um acompanhamento durante cinco dias, por meio de um formulário estruturado na plataforma Google Forms, no qual foram registradas informações clínicas, alimentares e relacionadas aos hábitos intestinais. O formulário está apresentado no Anexo 1. Após o término desse período, foi realizada uma única coleta de amostra fecal, correspondente à primeira evacuação após o preenchimento do formulário.

Após a coleta, as amostras fecais foram mantidas sob refrigeração, em temperatura entre 2°C e 8°C, sendo transportadas em caixa térmica contendo gelo reciclável. O prazo máximo entre a coleta e a análise foi de até 12 horas, visando preservar a integridade físico-química e microbiológica do material.

Para a realização da coleta, as amostras fecais foram acondicionadas em coletores universais estéreis, de plástico, com tampa rosqueável. Cada frasco foi devidamente identificado na tampa com as iniciais do nome e sobrenome da participante, visando garantir a rastreabilidade das amostras e a confidencialidade dos dados.

Após a coleta, os frascos foram envolvidos em papel alumínio e acondicionados em caixa térmica (isopor) contendo três unidades de gelo reciclável, com o objetivo de manter a temperatura adequada durante o transporte até o local de análise.

5.8 Ensaios experimentais para a padronização do protocolo

A padronização do protocolo de preparo das amostras fecais para análise por ER foi conduzida por meio de ensaios experimentais sequenciais. Foram avaliados parâmetros relacionados à aquisição espectral, ao preparo da amostra e ao acondicionamento do material, incluindo potência do laser, tempo de aquisição, diluição da amostra, condições de centrifugação e tipo de porta-amostra.

Para avaliação dos parâmetros ópticos, foram testadas em amostras integras combinações de potência do laser de 150, 200, 250 e 350 mW associadas a tempos de aquisição de 1 e 3 segundos. Para os ensaios de diluição, aproximadamente 2 g de amostra fecal foram homogeneizados em volumes crescentes de água destilada variando entre 1 e 18 mL. As condições de centrifugação foram avaliadas por meio de diferentes combinações de velocidade e tempo, visando promover a separação das fases da amostra e reduzir sua heterogeneidade. Também foram comparados dois tipos de porta-amostra: lâmina de microscópio revestida com papel alumínio e porta-amostra de aço inoxidável contendo seis poços. Os parâmetros foram avaliados quanto à qualidade espectral, relação sinal-ruído, estabilidade do espectro e reprodutibilidade das aquisições.

5.9 Protocolo de preparo de amostras fecais para análise Raman

Para o preparo das amostras, aproximadamente 2 g de material fecal foram diluídos em 12 mL de água destilada, diretamente em tubos Falcon de 14 mL, sendo posteriormente homogeneizados em agitador tipo vórtex (*Vórtex Basic Kasvi*, modelo K45-2820), até a obtenção de uma mistura uniforme. Em seguida, a amostra foi submetida a um primeiro ciclo de centrifugação em centrífuga SPINLAB (modelo SL-5M) a 2700 rpm por 5 minutos, seguido de um segundo ciclo a 4000 rpm pelo mesmo

tempo. Esse processo resultou na formação de três fases distintas: Sobrenadante (SN), fase Intermediária (INT) e Corpo de Fundo (CF) conforme representado na figura 3. A fração INT foi cuidadosamente coletada com micropipeta automática ajustada em 50 μL , transferida para um porta-amostra de aço inoxidável e submetida à análise por ER dispersiva.



Figura 3: Separação das fases da amostra fecal após o protocolo de centrifugação.

As análises foram realizadas utilizando um espectrômetro Raman (*Dimension P-1, Lambda Solutions Inc.*, MA, EUA), acoplado a uma sonda Raman (*Vector Probe, Lambda Solutions Inc.*, MA, EUA), empregando radiação de excitação no comprimento de onda de 830 nm (infravermelho próximo) e potência de 350 mW na extremidade distal da sonda. A luz espalhada pela amostra foi coletada pela sonda e dispersa por uma grade de alta eficiência integrada ao espectrômetro, sendo detectada por uma câmera CCD na faixa espectral de 400 a 1800 cm^{-1} , com resolução aproximada de 2 cm^{-1} . Para cada amostra, os espectros Raman foram adquiridos em triplicata, com tempo de exposição de 30 s por espectro, visando assegurar a reprodutibilidade e confiabilidade dos dados obtidos. A metodologia está ilustrada no fluxograma representado na Figura 4.

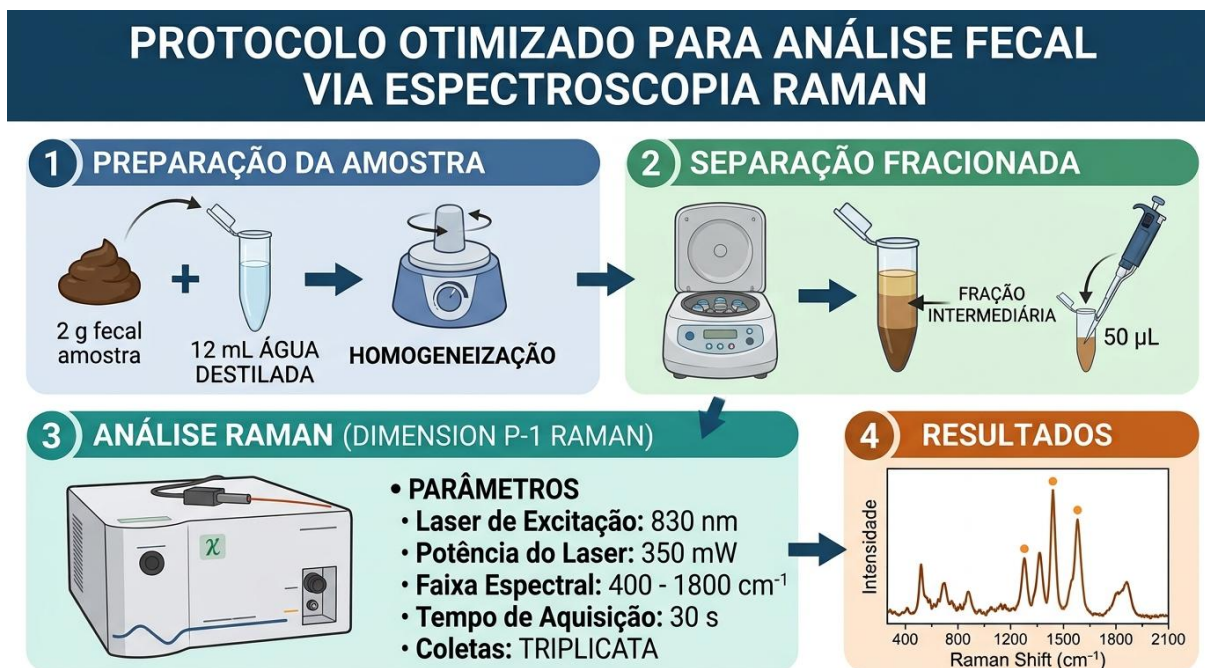


Figura 4: Processo de aquisição dos espectros Raman em amostras fecais.

5.10 Análise dos Dados

Após a aquisição, os espectros Raman foram processados no *software* MATLAB (*MathWorks*, EUA), sendo inicialmente corrigidos quanto à resposta espectral dos componentes ópticos do sistema (sonda, grade, caminho óptico do espectrógrafo e câmera CCD). Em seguida, os dados foram submetidos a uma rotina de pré-processamento, incluindo correção da linha de base e remoção da fluorescência de fundo. A fluorescência foi modelada por meio da rotina “*mpoly*”, que consiste no ajuste de uma função polinomial de sexta ordem à linha de base do espectro Raman, posteriormente subtraída, permitindo o realce das bandas de interesse.

Após essa etapa, os espectros foram submetidos à normalização pela área, procedimento que estabelece a intensidade de cada ponto espectral em relação à área integrada do respectivo espectro, possibilitando a comparação dos perfis espectrais entre as amostras e os grupos experimentais. Espectros que apresentaram autofluorescência excessiva, comprometendo a identificação dos sinais espectrais de interesse, foram classificados como outliers e excluídos do conjunto de dados.

Por fim, os dados processados foram transferidos para o Microsoft Excel, onde foram gerados gráficos para a análise e interpretação dos resultados. Os gráficos

foram gerados a partir da média das triplicatas, posteriormente, da média geral do GS, GC e GDCh. Esse protocolo metodológico foi adotado com o objetivo de garantir a robustez das análises espectrais em amostras fecais e possibilitar a identificação de diferenças bioquímicas entre os grupos estudados, contribuindo para a investigação de possíveis alterações associadas à inflamação intestinal.

5.11 Avaliação da reprodutibilidade do protocolo Raman

Com o objetivo de avaliar a estabilidade experimental do protocolo desenvolvido, cada amostra fecal foi analisada em triplicata técnica sob condições instrumentais idênticas. Os espectros obtidos apresentaram comportamento espectral semelhante quanto ao posicionamento das bandas Raman e ao perfil espectral global, sem deslocamentos relevantes entre aquisições consecutivas da mesma amostra.

Embora não tenham sido realizadas métricas quantitativas formais de reprodutibilidade, como coeficiente de variação das intensidades espectrais ou correlação entre replicatas, a consistência observada entre as aquisições sugere adequada estabilidade experimental do protocolo proposto para fins exploratórios e metodológicos. Estudos futuros deverão incorporar análises estatísticas específicas para validação analítica completa da precisão e reprodutibilidade do método.

6. RESULTADOS

6.1 Padronização e definição do protocolo Raman

6.1.1 Definição dos parâmetros ópticos

Foram avaliadas espectralmente amostras íntegras com diferentes combinações de potência do laser e tempo de exposição. Dentre elas, a melhor relação sinal/ruído foi obtido com 350 mW, 30 segundos de exposição da amostra com concomitante coleta de sinal, sem que tenha sido observado alterações

macroscópicas da amostra, conforme apresentado no espectro abaixo, em vermelho (Figura 5).

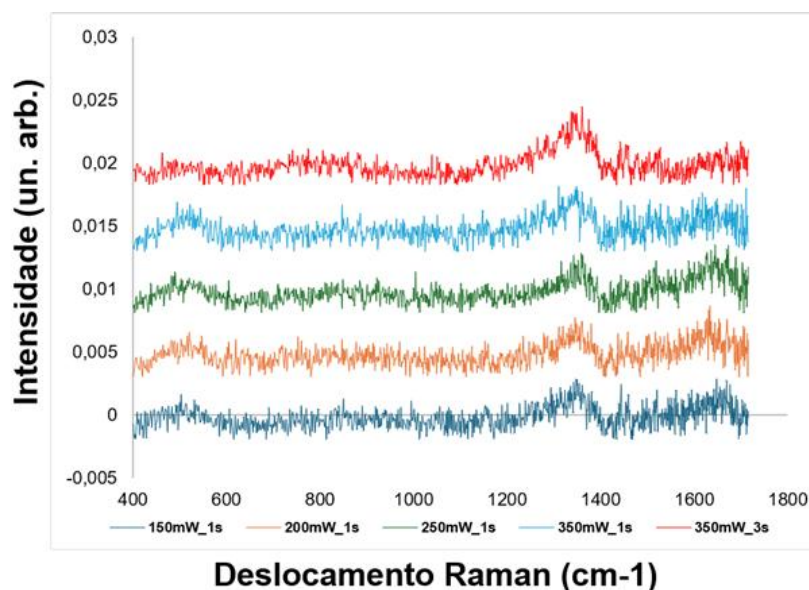


Figura 5: Definição da potência do laser e tempo de exposição.

6.1.2 Avaliação das condições de diluição

Na sequência foram realizadas diferentes diluições de amostras visando obter melhor qualidade espectral do sinal Raman, sendo que a diluição de 2 g de fezes em 12 mL de água destilada (em vermelho) apresentou melhor definição espectral tendo sido adotada como referência para o protocolo em questão (Figura 6).

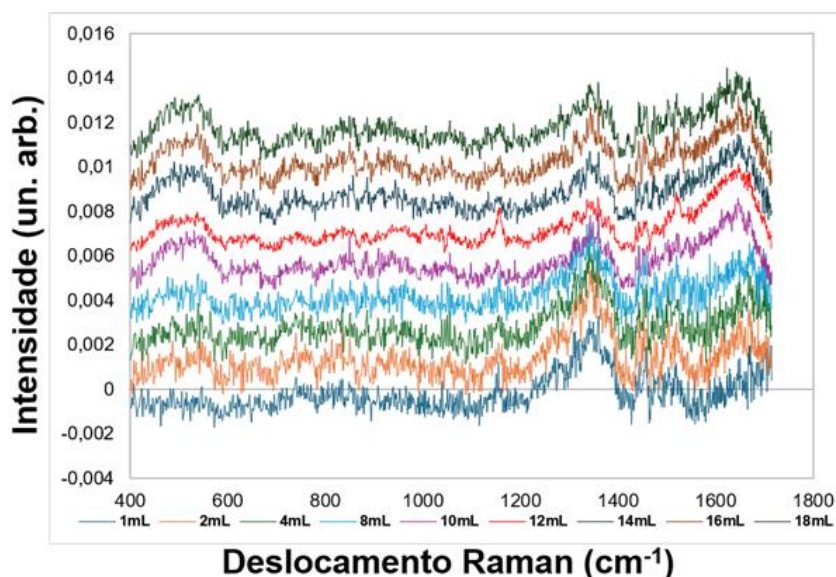


Figura 6: Influência da diluição da amostra na qualidade dos espectros.

6.1.3 Parâmetros de centrifugação

A centrifugação promoveu a separação da amostra em três fases distintas: SN, INT e CF. A condição composta por centrifugação a 2700 rpm por 5 minutos seguida de 4000 rpm por 5 minutos proporcionou melhor separação das fases e foi incorporada ao protocolo. A fase INT apresentou maior facilidade de aquisição e melhor reprodutibilidade para coleta. (Figura 7).

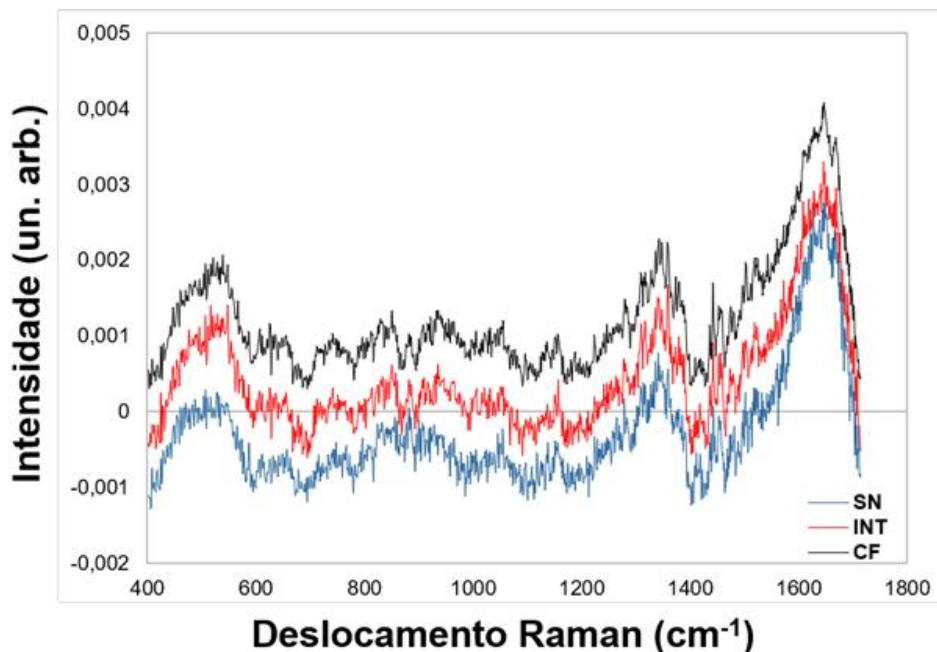


Figura 7: Sinal Raman referente as três fases de centrifugação.

6.1.4 Definição do porta-amostra

Dentre os dois tipos de porta-amostra testados, lâmina de vidro e poços estampados em chapa de aço inoxidável, não foram observadas diferenças espectrais relevantes. Entretanto, o porta-amostra de aço inoxidável apresentou vantagens operacionais relacionadas à deposição da amostra, higienização e reutilização, sendo selecionado para as análises subsequentes.

6.2 Análise espectral das amostras fecais

A Figura 8 apresenta os espectros Raman médios das amostras fecais dos grupos GS, GDC, GDCh, além de demonstrar a diferença espectral entre (GDC – GS) e (GDCh – GS).

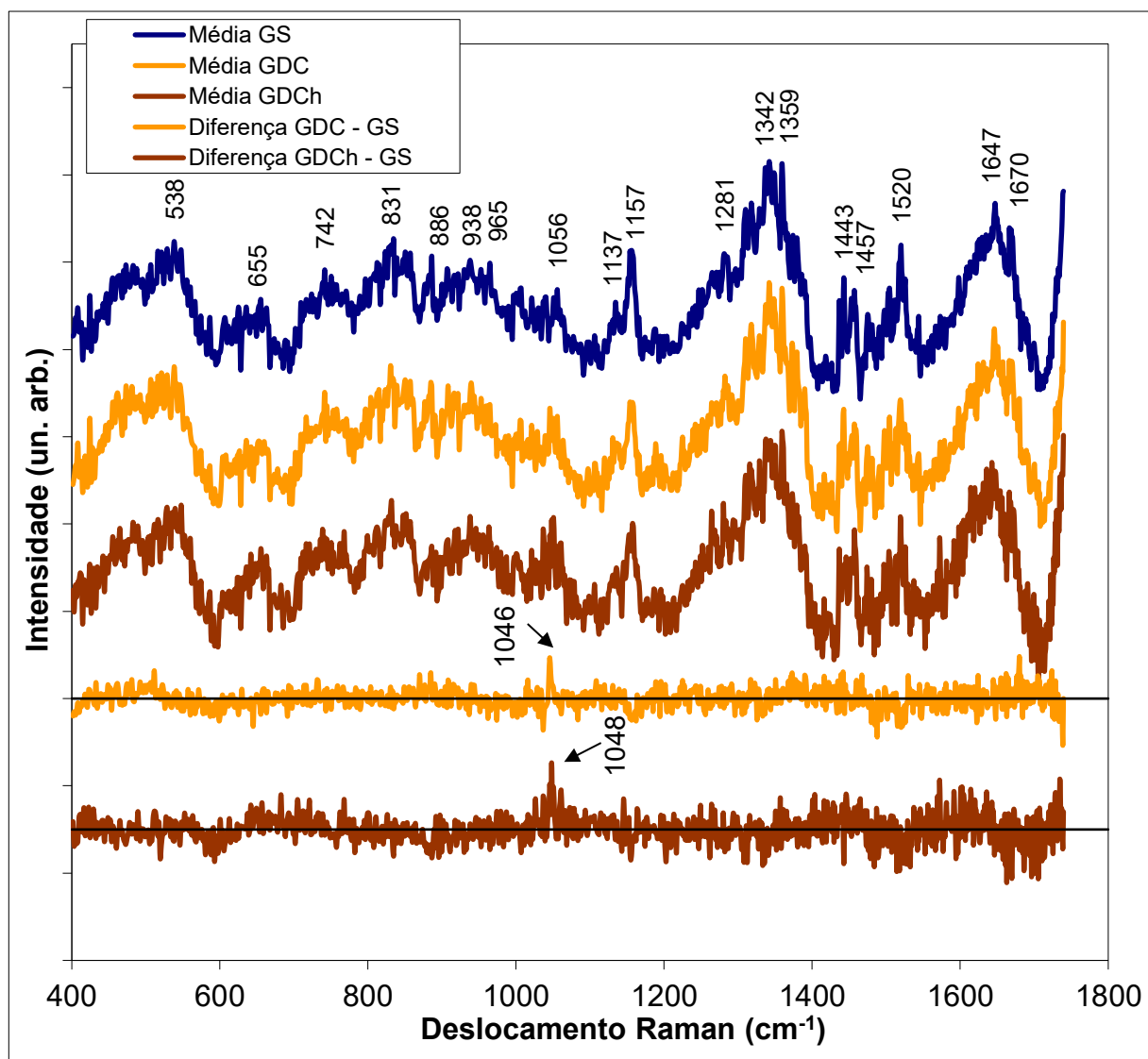


Figura 8: Espectros dos grupos GS, GDC e GDCh.

Os picos identificados em 538 e 655 cm^{-1} estão relacionados à presença de cisteína e cistina, aminoácidos que contêm enxofre em sua estrutura. O pico em 742 cm^{-1} está associado à hipoxantina, e o de 831 cm^{-1} à tirosina. O pico em 886 cm^{-1} está relacionado à presença de polissacarídeos, incluindo componentes celulósicos, enquanto o pico em 938 cm^{-1} está associado à prolina e hidroxiprolina, enquanto os picos em 965 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} estão relacionados à lignina. Já os picos em 1056 e 1137 cm^{-1} são atribuídos a compostos lipídicos, e os picos em 1157 e 1520 cm^{-1} são característicos de carotenoides. Os picos em 1342 e 1359 cm^{-1} estão relacionados ao triptofano, e os picos em 1647 e 1670 cm^{-1} correspondem à Amida I, associada às proteínas.

Na análise das diferenças entre os espectros médios dos grupos GDC – GS e GDCh – GS, foram observadas respectivamente bandas em 1046 e 1048 cm^{-1} , tendo sido destacadas nos grupos patológicos GDC e GDCh. A região de 1046–1048 cm^{-1} é atribuída ao nitrato (NO_3^-), principalmente ao modo vibracional de estiramento simétrico das ligações N–O, sugerindo a contribuição desse composto para as alterações espectrais observadas nos grupos patológicos em relação ao grupo saudável.

A Figura 9 apresenta os cinco primeiros Componentes Principais (PCs) extraídos do conjunto de dados. A análise conjunta dos loadings e scores permite identificar as principais contribuições espectrais e sua relação com os grupos avaliados. Foram considerados os cinco primeiros PCs, uma vez que, a partir do PC6, observou-se aumento do ruído espectral, dificultando a interpretação de seus componentes.

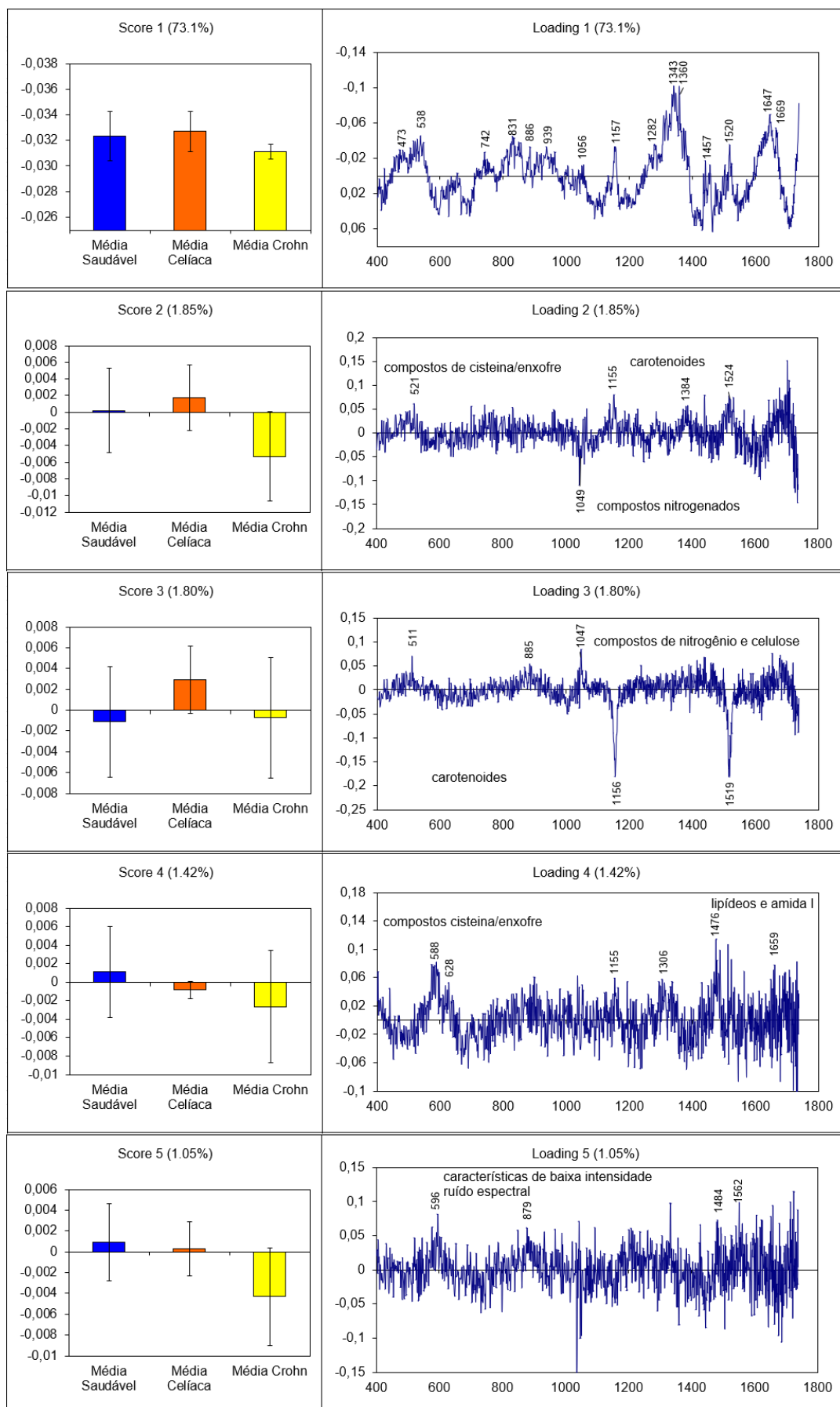


Figura 9: Plotagem dos 5 primeiros PCs referentes às amostras fecais.

6.3 Análise exploratória por PCA

O PCA permitiu explorar a variabilidade espectral das amostras e identificar as principais regiões do espectro Raman responsáveis pela distribuição dos grupos. Os *loadings* representam a contribuição relativa de cada região espectral para a formação dos componentes, enquanto os *scores* permitem visualizar a distribuição das amostras e relacionar essas contribuições espectrais aos diferentes grupos avaliados. O PC1, responsável por 73,1% da variância total, apresentou no *loading* 1 as principais características espectrais observadas no espectro Raman médio das amostras, refletindo a contribuição dos componentes bioquímicos predominantes da matriz fecal. Já o PC2, responsável por 1,85% da variância, apresentou contribuições positivas nas regiões de 521, 1155, 1384 e 1524 cm^{-1} , associadas à cisteína/compostos contendo enxofre e carotenoides, com maior contribuição para a distribuição das amostras dos grupos GDC e GS. Em contrapartida, a região em 1049 cm^{-1} , associada ao nitrato, apresentou contribuição negativa no PC2, relacionada principalmente à distribuição das amostras do grupo GDCh.

No PC3, responsável por 1,80% da variância, observou-se uma relação inversa entre as contribuições espectrais, com as regiões de 511, 885 e 1047 cm^{-1} , associadas respectivamente a compostos contendo enxofre, polissacarídeos/celulose e nitrato, apresentando maior contribuição para a distribuição das amostras do grupo GDC, enquanto as bandas em 1156 e 1519 cm^{-1} , características dos carotenoides, estiveram relacionadas às amostras dos grupos GS e GDCh. No PC4, responsável por 1,42% da variância, destacaram-se as bandas em 588, 628, 1155, 1306, 1476 e 1659 cm^{-1} , relacionadas principalmente a compostos contendo enxofre/cisteína, carotenoides, lipídios e Amida I, com maior contribuição para a distribuição das amostras do GS. A partir do PC5, observou-se aumento da contribuição de ruídos nos *loadings*, comprometendo a interpretação das características espectrais, portanto, os componentes subsequentes não foram considerados na análise.

7. DISCUSSÃO

Em um estudo voltado para o diagnóstico de DII, Acri et al. (2020) utilizou a ER para diferenciar pessoas saudáveis daqueles acometidos por DCh e RU. Apesar das diferenças dos parâmetros ópticos utilizados para obtenção do sinal Raman entre ambos os estudos, tais trabalhos conseguiram identificar diferenças espectrais em

pacientes com DCh e indivíduos saudáveis, demonstrando o potencial da técnica para tal diagnóstico.

Ling et al. (2025), ao trabalharem com amostras fecais para análise por Espectroscopia Raman de célula única (SCRS), utilizaram diluição aquosa e centrifugação em duas etapas no preparo das amostras, obtendo resultados satisfatórios na padronização do protocolo. Essa abordagem corrobora os resultados obtidos no presente estudo, no qual o uso combinado dessas etapas contribuiu para a adequada homogeneização e separação dos componentes da amostra, favorecendo a obtenção de espectros com melhor qualidade.

Após a otimização das etapas de diluição em água destilada e centrifugação sequencial, a fase INT, obtida após a centrifugação, foi selecionada para as análises subsequentes por apresentar coloração mais clara, característica considerada favorável à interação da luz com a amostra e à coleta da radiação retroespalhada, favorecendo a relação sinal/ruído. Em contrapartida, a fase SN apresentou aspecto altamente translúcido, associado a uma menor relação sinal/ruído nos espectros obtidos, enquanto a fase CF apresentou maior densidade e presença de material particulado, dificultando sua aspiração e transferência para o porta-amostra por meio da pipeta automática.

Outras estratégias de preparo de amostras fecais são descritas na literatura, variando conforme o objetivo da análise e os componentes de interesse. Acri et al. (2020) utilizaram um extrato proteico obtido da mesma amostra destinada à análise de calprotectina por ELISA, com o objetivo de caracterizar proteínas por ER, enquanto Fornasaro et al. (2022) empregaram metanol para a extração de metabólitos, ambos autores obtiveram espectros de qualidade nas regiões de interesse de seus estudos. Como no presente trabalho, a extração de uma estrutura molecular específica não fazia parte dos objetivos, a diluição foi realizada utilizando água destilada, e dessa forma possibilitou a obtenção de espectros reprodutíveis e informações espectrais relevantes diretamente da matriz fecal, demonstrando seu potencial para sua caracterização por ER.

A qualidade dos espectros obtidos permitiu ainda a identificação de bandas espectrais com potencial de associação aos componentes específicos da matriz fecal, possibilitando sua interpretação à luz de achados previamente descritos na literatura, conforme descrito a seguir. Marzullo et al. (2007), ao caracterizarem espectros FT-Raman de margens de lesões de carcinoma ductal infiltrante, identificaram uma banda

em 538 cm^{-1} , atribuída às pontes dissulfeto (S–S) da cisteína, destacando sua relevância na diferenciação entre tecidos normais e patológicos. No presente estudo, a presença de uma banda na mesma região espectral sugere a contribuição de estruturas contendo enxofre, sendo compatível com a contribuição da cisteína no perfil Raman das amostras fecais. Yang et al. (2022), por sua vez, ao investigarem espectros Raman e SERS de diferentes componentes biológicos, incluindo aminoácidos, descreveram bandas associadas às características vibracionais da cisteína, fornecendo suporte para a atribuição da região de 655 cm^{-1} observada neste estudo. Dessa forma, a ocorrência conjunta das bandas em 538 e 655 cm^{-1} sugere a contribuição de compostos sulfurados, particularmente da cisteína, para o perfil espectral das amostras fecais.

Cheng et al. (2023), ao investigarem a aplicação de SERS na quantificação de derivados de purina liberados por bactérias, identificaram uma banda intensa em 742 cm^{-1} referente à hipoxantina, associada ao modo vibracional de respiração do anel purínico. Os autores destacaram que os derivados de purina apresentam bandas características na região entre 500 e 850 cm^{-1} , sendo a banda em 742 cm^{-1} uma das principais assinaturas espectrais da hipoxantina.

Por outro lado, Amorim et al. (2024), ao analisarem por ER o tecido hipocampal de ratos diabéticos, identificaram alterações no perfil vibracional dos tecidos, incluindo uma banda em 831 cm^{-1} , atribuída à tirosina. Movasaghi et al. (2007) também associaram a banda em 831 cm^{-1} à tirosina, corroborando a atribuição anteriormente apresentada para esse pico no presente estudo. Adicionalmente, os autores relacionaram a banda em 886 cm^{-1} a polissacarídeos, incluindo componentes associados à celulose, cuja presença nas amostras fecais pode estar relacionada à fração de componentes vegetais não completamente degradados durante a digestão. Os autores também descreveram bandas em 1056 e 1137 cm^{-1} relacionadas a lipídios e ácidos graxos, contribuindo para a caracterização dos componentes lipídicos presentes em sistemas biológicos.

Assim como o conteúdo associado a celulose, Bock e Gierlinger (2019), ao caracterizarem por ER diferentes subestruturas da lignina, identificaram bandas em 965 e 1457 cm^{-1} associadas às características vibracionais desse polímero fenólico. A lignina é um dos principais componentes estruturais da parede celular vegetal,

conferindo resistência, rigidez e proteção aos tecidos vegetais, sendo encontrada principalmente em alimentos de origem vegetal ricos em fibras.

Calogiuri et al. (2024), ao utilizarem microespectroscopia Raman para investigar células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma colorretal e utilizadas como modelo de epitélio intestinal, avaliaram alterações bioquímicas relacionadas à integridade das junções estreitas. Nesse contexto, os autores identificaram uma banda em $937\text{--}938\text{ cm}^{-1}$, atribuída principalmente às vibrações da prolina e hidroxiprolina. No presente estudo, a presença da banda em 938 cm^{-1} apresenta correspondência com essa atribuição, sugerindo a contribuição desses aminoácidos para o perfil espectral das amostras fecais e, considerando sua identificação no contexto da avaliação da barreira epitelial intestinal, podendo estar relacionada à composição proteica associada às estruturas de junção celular.

Addis et al. (2016), ao utilizarem ER em biópsias colônicas de pacientes com colite ulcerativa, identificaram bandas características de carotenoides em 1155 e 1518 cm^{-1} , correspondentes às regiões de estiramento C–C e C=C, respectivamente, da cadeia poliênica desses compostos. Os autores observaram ainda maior intensidade dessas bandas no tecido inflamado em comparação ao tecido em remissão. No presente estudo, a presença das bandas em 1157 e 1520 cm^{-1} apresenta correspondência com essas assinaturas Raman, corroborando sua atribuição aos carotenoides e indicando sua contribuição para o perfil espectral das amostras fecais.

Hernández et al. (2024), ao investigarem as relações entre as características conformacionais e vibracionais do triptofano por ER, caracterizaram os marcadores desse aminoácido, destacando bandas na região de $1340\text{--}1360\text{ cm}^{-1}$ associadas às características vibracionais do anel indólico. No presente estudo, foram observadas bandas em 1342 e 1359 cm^{-1} , apresentando correspondência com as regiões espectrais descritas pelos autores, corroborando a atribuição desses picos à contribuição do triptofano.

Adicionalmente, Acri et al. (2020), ao investigarem a aplicação da ER como método não invasivo para o diagnóstico de DII com início na infância, identificaram a banda Amida I, caracterizada por uma banda intensa na região próxima a 1650 cm^{-1} , relacionada principalmente às vibrações de estiramento da ligação C=O das ligações peptídicas e às características estruturais das proteínas. No presente estudo, foram observadas bandas em 1647 e 1670 cm^{-1} , ambas localizadas na região característica da Amida I, corroborando a contribuição de componentes proteicos para o perfil

espectral das amostras fecais. A presença dessas bandas reforça a contribuição de estruturas proteicas para a composição espectral da matriz fecal e sua relevância na caracterização das alterações associadas à DII.

Por fim, na análise das diferenças entre os grupos, observou-se uma diferença na região de $1046\text{--}1048\text{ cm}^{-1}$, evidenciada nas comparações GDC – GS e GDCh – GS, correspondendo a um aumento relativo do sinal nessa região dos grupos patológicos em relação ao GS. Kauffmann e Fontana (2015), ao avaliar sais inorgânicos dissolvidos em soluções aquosas por ER, demonstraram a dependência da concentração de nitrato com a intensidade da banda em 1047 cm^{-1} , descrita como específica do ânion NO_3^- . Dessa forma, a correspondência entre as bandas observadas em 1046 e 1048 cm^{-1} e a região característica do nitrato descrita na literatura corrobora a possível contribuição desse composto para as diferenças espectrais observadas nos grupos patológicos.

Na análise das características dos voluntários do GS, estes apresentaram a média de uma evacuação/dia, consistência fecal média de 3 na Escala de Bristol e ingestão hídrica aproximada de 1 L/dia. A consistência fecal observada, classificada como tipo 3, é compatível com fezes formadas e, portanto, dentro de um padrão considerado fisiológico normal. Entretanto, a menor ingestão hídrica identificada nesse grupo pode constituir um fator associado à ocorrência de constipação, relatada por 4 das 9 voluntárias (44,4%).

No GDC, observou-se média de uma evacuação/dia e consistência fecal média de 3 na Escala de Bristol, semelhante ao GS, porém com ingestão hídrica de 2 L /dia. Duas das quatro voluntárias (50,0%) relataram dor abdominal. Dessa forma, apesar da frequência e da consistência fecal média serem semelhantes às observadas no GS, a presença de dor abdominal em metade das participantes evidencia manifestações GI que podem ocorrer independentemente de alterações na frequência evacuatória, na consistência das fezes e na hidratação.

O GDCh apresentou o perfil intestinal mais distinto entre os grupos, com média de três evacuações/dia, consistência fecal média de 5 na Escala de Bristol e ingestão hídrica aproximada de 1,5 L/dia. A consistência tipo 5 caracteriza fezes mais amolecidas em comparação aos tipos observados nos demais grupos, embora, isoladamente, não seja classificada como diarreia pela Escala de Bristol, sendo os tipos 6 e 7 os mais compatíveis com esse quadro. A maior frequência evacuatória, associada à consistência mais amolecida, sugere maior velocidade do trânsito

intestinal no GDCh. Além disso, todas as voluntárias avaliadas (2/2; 100,0%) relataram dor abdominal, reforçando a presença de manifestações GI nesse grupo.

Em relação aos relatos alimentares, observou-se a presença recorrente de arroz nos três grupos, acompanhado por diferentes fontes de frutas, verduras, sementes e leguminosas. Entre os grupos, verificou-se maior diversidade de alimentos de origem vegetal nos grupos DC e DCh, enquanto o GS apresentou maior heterogeneidade alimentar, com participação mais evidente de alimentos processados e ultraprocessados, embora também tenha sido identificado o consumo de frutas e hortaliças. No grupo DC, destacaram-se frutas e hortaliças, enquanto no grupo DCh observou-se maior presença de sementes, fontes de fibras, frutas e vegetais.

A ocorrência de bandas atribuídas a carotenoides em todos os grupos pode, portanto, ser considerada compatível com a presença de diferentes fontes dietéticas desses compostos nos três grupos. Esse achado é particularmente relevante porque demonstra que a presença desses sinais espectrais não esteve restrita aos grupos patológicos, podendo refletir, a composição alimentar e a incorporação ou eliminação desses compostos na matriz fecal.

Por outro lado, a banda atribuída ao nitrato foi observada nos grupos DC e DCh. Os relatos desses grupos apresentaram diversas fontes alimentares potencialmente relacionadas à presença de nitratos, especialmente hortaliças folhosas, além de outros vegetais. Entretanto, fontes alimentares de nitrato também foram identificadas no GS, dessa forma, a distribuição dos alimentos relatados não permite atribuir a ocorrência do sinal de nitrato exclusivamente ao consumo alimentar dos grupos patológicos. Considerando a ausência de dados quantitativos de ingestão, bem como a complexidade da matriz fecal, a presença dessa banda pode estar relacionada à interação entre fatores dietéticos e metabólicos, não sendo possível estabelecer, neste estudo, uma associação causal entre o consumo de determinado alimento e o sinal espectral observado.

8. CONCLUSÃO

O protocolo desenvolvido demonstrou ser capaz de gerar espectros reprodutíveis a partir da fração intermediária de amostras fecais humanas, estabelecendo parâmetros experimentais adequados para futuras investigações envolvendo matrizes biológicas complexas. A aplicação preliminar do método em

indivíduos saudáveis, pacientes com DC e pacientes com DCh evidenciou tendências espectrais distintas entre os grupos, particularmente em regiões associadas a compostos nitrogenados, aminoácidos e componentes estruturais celulares. Entretanto, devido ao caráter exploratório do estudo e ao reduzido número amostral, especialmente no GDCh, os resultados devem ser interpretados como evidências preliminares, sendo necessários estudos futuros com maior poder estatístico e validação por métodos metabolômicos complementares para confirmação dos achados observados.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os achados deste estudo devem ser interpretados considerando seu caráter metodológico e exploratório, cujo foco principal concentrou-se na padronização analítica da ER aplicada a amostras fecais humanas. Dessa forma, os resultados obtidos estabelecem bases experimentais importantes para futuras investigações clínicas com maior número amostral, validação biomolecular e maior robustez estatística.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. O reduzido número amostral caracteriza a pesquisa como um estudo piloto, limitando a robustez estatística dos achados. Além disso, a elevada complexidade da matriz fecal e a variabilidade biológica individual podem interferir nos perfis espectrais obtidos.

A heterogeneidade clínica das participantes com inflamação intestinal, associada à ausência de correlação com marcadores clínicos e laboratoriais específicos, também restringe interpretações mais aprofundadas dos resultados. Do ponto de vista técnico, a presença de autofluorescência e a baixa relação sinal/ruído em alguns espectros dificultaram a identificação precisa de determinadas bandas espectrais.

Por fim, a ausência de validação externa e de comparação com métodos metabolômicos convencionais limita a confirmação bioquímica dos achados, reforçando a necessidade de estudos futuros com maior número amostral e maior padronização clínica e analítica.

10. REFERÊNCIAS

- ACRI, G.; VENUTI, V.; COSTA, S. et al. Raman spectroscopy as noninvasive method of diagnosis of pediatric onset inflammatory bowel disease. **Applied Sciences**, v. 10, n. 19, p. 6974, 2020.
- ADDIS, J.; MOHAMMED, N.; ROTIMI, O. et al. Raman spectroscopy of endoscopic colonic biopsies from patients with ulcerative colitis to identify mucosal inflammation and healing. **Biomedical Optics Express**, v. 7, n. 5, p. 2022-2035, 2016.
- ALLAKHVERDIEV, E. S. et al. **Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research**. CellsMDPI, 2022.
- AL-RASHIDI, H. E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1628-1643, 2022.
- AMORIM, M. S. N.; RATES, E. R. D.; MELO, I. V. A. C. et al. Diabetes and cognitive decline: an innovative approach to analyzing the biophysical and vibrational properties of the hippocampus. **ACS omega**, v. 9, n. 39, p. 40870-40881, 2024.
- BOCK, P.; GIERLINGER, N. Infrared and Raman spectra of lignin substructures: Coniferyl alcohol, abietin, and coniferyl aldehyde. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 50, n. 6, p. 778-792, 2019.
- CALOGIURI, A.; BELLISARIO, D.; SCIURTI, E. et al. Non-invasive real-time investigation of colorectal cells tight junctions by Raman microspectroscopy analysis combined with machine learning algorithms for organ-on-chip applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 12, p. 1458404, 2024.
- CHENG, H. W.; TSAI, H. M.; WANG, Y. L. Exploiting purine as an internal standard for SERS quantification of purine derivative molecules released by bacteria. **Analytical Chemistry**, v. 95, n. 46, p. 16967, 2023.
- DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 163-176, 2011.
- DE SOUZA, H. S. P; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13-27, 2016.
- EMBER, K. J. I. et al. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. **npj Regenerative Medicine**, v. 2, n. 1, 2017.
- FORNASARO, S.; ESPOSITO, A.; FLORIAN, F. et al. Spectroscopic investigation of faeces with surface-enhanced Raman scattering: a case study with coeliac patients on gluten-free diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 11, p. 3517-3527, 2022.
- GERALDES, C. F. G. C. **Introduction to infrared and raman-based biomedical molecular imaging and comparison with other modalities**. Molecules. MDPI AG, 2020.

HANLON, E. B; MONOHARAN, R; KOO, T. W. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, 2000.

HERNÁNDEZ, B.; COÏC, Y. M.; KRUGLIK, S. G. et al. Relationships between conformational and vibrational features of tryptophan characteristic Raman markers. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 316, p. 124377, 2024.

HERRERA, M.; BYERLEY, L. O. Dietary Nitrogen and Its Role in the Gut Microbiome and Inflammatory Bowel Disease: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 17, n. 14, p. 2373, 2025.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R. et al. Estrutura, função e diversidade do microbioma humano saudável. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012.

IEZZI, L. E.; MADEIROS, B.; FEITOSA, M. et al. Association between celiac disease and Crohn's disease-a challenge to the coloproctologist. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 32, n. 3, p. 329-333, 2012.

JAŠAREVIĆ, E.; BALE, T. L. Prenatal and postnatal contributions of the maternal microbiome on Offspring programming. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 55, p. 100797, 2019.

KAUFFMANN, T. H.; FONTANA, M. D. Inorganic salts diluted in water probed by Raman spectrometry: Data processing and performance evaluation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 154-161, 2015.

KAUFFMANN, T. H.; KOKANYAN, N.; FONTANA, M. D. Use of Stokes and anti-Stokes Raman scattering for new applications. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 50, n. 3, p. 418–424, 2019.

KRYNICKA, P.; KOULAOUZIDIS, G.; SKONIECZNA-ŻYDECKA, K. et al. Application of raman spectroscopy in non-invasive analysis of the gut microbiota and its impact on gastrointestinal health. **Diagnostics**, v. 15, n. 3, p. 292, 2025.

LEBWOHL, B; SANDERS, D. S.; GREEN, P. H. R. Coeliac disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 70-81, 2018.

LING, B.; WANG, F.; WU, H. et al. In situ identification of toxin-producing *Clostridioides difficile* in stool samples based on single-cell Raman spectroscopy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 1556536, 2025.

LIU, K. et al. Raman Spectroscopy: A Novel Technology for Gastric Cancer Diagnosis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

LONG, D. A. **The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules**. Wiley, 2002.

LOTZ, M.; GÜTLE, D.; WALTHER, S. et al. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 973-984, 2000.

MANN, E. R.; LAM, Y. K.; UHLIG, H. H. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 24, n. 8, p. 577-595, 2024.

MARANDUBA, C. M. C.; CASTRO, S. B. R.; SOUZA, G. T. et al. Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. **Journal of immunology research**, v. 2015, n. 1, p. 931574, 2015.

MARCHESI, J. R.; HOLMES, E.; KHAN, F. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 546-551, 2007.

MARZULLO, A. C. M.; NETO, O. P.; MARTIN, A. A. et al. FT-Raman spectra of the border of infiltrating ductal carcinoma lesions. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 5, p. 455-460, 2007.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493–541, 2007.

NAKOV, R.; VELIKOVA, T. Chemical metabolism of xenobiotics by gut microbiota. **Current Drug Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 260-269, 2020.

PASCUAL, V.; DIELI-CRIMI, R.; LÓPEZ-PALACIOS, N. et al. Inflammatory bowel disease and celiac disease: overlaps and differences. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 17, p. 4846, 2014.

PENCE, I. J.; BEAULIEU, D. B.; HORST, S. N. et al. Clinical characterization of in vivo inflammatory bowel disease with Raman spectroscopy. **Biomedical optics express**, v. 8, n. 2, p. 524-535, 2017.

PENCE, I.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. **Chemical Society Reviews**. Royal Society of Chemistry, 2016.

QI, Y.; CHEN, E. X.; HU, D. et al. Applications of Raman spectroscopy in clinical medicine. **Food Frontiers**, v. 5, n. 2, p. 392-419, 2024.

RAMAN, C., KRISHNAN, K. A New Type of Secondary Radiation. **Nature** **121**, 501–502 (1928). <https://doi.org/10.1038/121501c0>.

RODA, G.; CHIEN NG, S.; KOTZE, P. G. et al., Crohn's disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 22, 2020.

RYDER, A. G.; VINCENTIS, J. D.; LI, B. et al. A stainless steel multi-well plate (SS-MWP) for high-throughput Raman analysis of dilute solutions. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 10, p. 1266-1275, 2010.

SIMÕES, C. D.; MAGANINHO, M.; SOUSA, A. S. FODMAPs, inflammatory bowel disease and gut microbiota: updated overview on the current evidence. **European journal of nutrition**, v. 61, n. 3, p. 1187-1198, 2022.

THAISS, C. A.; ZMORA, N.; LEVY, M. et al. The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65-74, 2016.

TIAN, C.; RANASINGHE, I. R.; HSU, R. Crohn Disease. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2025.

VERDU, E. F.; GALIPEAU, H. J.; JABRI, B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 9, p. 497-506, 2015.

YANG, Z.; SU, H. S; YOU, E. M. et al. High uniformity and enhancement Au@ AgNS 3D substrates for the diagnosis of breast cancer. **Acs Omega**, v. 7, n. 17, p. 15223, 2022.

ANEXO 1

Monitoramento da atividade intestinal

Tabela 2 - Monitoramento da atividade intestinal condição patológica

Vol.	Data	H	Id.	Cond.	ED	CF	HD	SGI
BFB	01/11/25	10:13	26	Celiaca	1 (100%)	3 (60%) 2 (40%)	3L (100%)	Flatulência (40%)
MCLF	05/11/25	09:30	30	Celiaca	1 (80%)	3 (60%) 4 (20%)	2,5L (40%) 3L (20%) 2L (20%)	Ausente
NIMD	06/11/25	08:14	40	Celiaca	1 (60%) 2 (20%)	3 (60%) 5 (20%)	1L (60%)	Dor abdominal (40%)
SCCS	30/10/2 5	09:45	47	Celiaca	1 (50%) 2 (33%)	4 (33%) 5 (33%)	1,5L (50%) 2L (33%)	Flatulência (33%) Dor abdominal (33%)
RMS	29/10/2 5	17:45	22	Doença de Crohn	1 (80%) 2 (20%)	4 (60%) 3(20%) 5 (20%)	2L (50%) 1,5L (25%) 1L (25%)	Dor abdominal (40%) Inchaço (20%)
TAS	11/11/25	14:15	37	Doença de Crohn	3 (60%) 6 (20%) 10 (20%)	6 (60%) 7 (40%)	1,5L (60%) 1L (40%)	Flatulência (100%) Diarreia (40%) Dor Abdominal (40%)

Legenda: Evacuações Diárias (ED); Consistência das Fezes (CF); Hidratação Diária (HD); Sintomas Gastrointestinais (SGI)

Alimentação Celíacas:

BFB: alimentação predominantemente proteica e composta por alimentos pouco processados, com alta frequência de frango, ovos, queijo cottage, shakes e barras proteicas, além de castanhas e levedura nutricional. Os carboidratos são provenientes principalmente de arroz, batata-doce, frutas, granola e macarrão konjac, enquanto os lipídeos são representados sobretudo por castanhas, ovos e laticínios. Destaca-se o consumo frequente e diversificado de frutas, verduras e legumes, como goiaba, banana, mexerica, morango, melão, brócolis, tomate, abóbora, abobrinha e berinjela.

MCLF: Alimentação predominantemente proteica e pouco processada, com elevada frequência de frango, ovos, queijo cottage, castanhas e suplementos proteicos. Os carboidratos são principalmente provenientes de arroz, batata-doce, frutas e granola, enquanto os lipídeos derivam sobretudo de castanhas, ovos e laticínios. Destaca-se ainda o consumo diversificado de frutas, verduras e legumes, fornecendo fibras e compostos bioativos de origem vegetal.

NIMD: Alimentação com predomínio de carboidratos, provenientes principalmente de arroz, batata, torradas, bolo, pizza e produtos sem glúten. As proteínas são obtidas principalmente de carne bovina, frango, bacon, ovos e carne moída, enquanto os lipídeos estão associados às carnes, bacon, empanados, queijo e preparações de maior densidade energética. Há baixo consumo de frutas e vegetais, com presença

pontual de banana e batata, resultando em menor variedade de fontes de fibras e compostos bioativos vegetais.

SCCS: Alimentação com predomínio de carboidratos, principalmente arroz, tapioca, pães e produtos sem glúten, bolos e massas. As proteínas são provenientes principalmente de carnes bovina e de frango, presunto, feijão e derivados, enquanto os lipídeos estão associados às carnes, queijos, requeijão, molhos e castanhas. Há consumo regular de frutas, verduras e legumes, como maçã, mamão, manga, banana, rúcula, tomate, abobrinha, vagem, cenoura, couve, palmito e jiló.

Tabela 3 - Monitoramento da atividade intestinal condição saudável.

Vol.	Data	H.	Id.	Cond.	ED	CF	HD	SGI
BVM	13/11/25	09:20	26	Saudável	2(100%)	4 (100%)	1,5L (60%) 1L (40%)	Ausente
CASS	30/10/25	07:25	56	Saudável	2 (60%) 1 (40%)	3 (100%)	1L (100%)	Ausente
MB	05/11/25	20:10	41	Saudável	1 (60%) 2 (40%)	4 (60%) 3 (20%)	1,5L (60%) 2L (40%)	Flatulência (20%) Inchaço (20%)
MGF	29/10/25	21:25	26	Saudável	1 (60%)	1 (20%) 2 (20%) 5 (20%)	500ml (60%) 700ml (40%)	Constipação (40%)
MSM	06/11/25	08:30	46	Saudável	1 (60%) 2 (20%)	5 (60%) 4 (20%)	1L (60%) 1,5 (40%)	Flatulência (20%)
MSS	11/11/25	05:30	22	Saudável	1 (40%) 2(20%)	3 (40%) 7 (20%)	500ml (40%) 300ml (40%) 700ml (20%)	Dor Abdominal (20%)
MVCL	25/11/25	08:30	20	Saudável	0 (60%) 1(40%)	3 (40%)	1L (100%)	Constipação (60%) Flatulência (20%)
SEBA	05/11/25	19:40	23	Saudável	0 (60%) 1 (20%)	3 (100%)	500ml (60%) 300ml (40%)	Constipação (60%)
SSFS	30/10/25	07:40	23	Saudável	1 (80%)	5 (60%) 3 (20%)	2L (100%)	Constipação (40%) Flatulência (20%)

Alimentação Doença de Crohn

RMS: Alimentação rica em proteínas, fibras e alimentos pouco processados, com presença frequente de ovos, frango, carne suína, feijão e lentilha. Os carboidratos são

provenientes principalmente de arroz, pães integrais, quinoa e tapioca, enquanto as gorduras derivam principalmente de sementes, ovos e carnes. Destaca-se o elevado consumo de fibras e compostos bioativos, provenientes de chia, linhaça, psyllium, sementes de abóbora, frutas, verduras e legumes, como mamão, manga, tomate, brócolis, rúcula, agrião e cenoura.

TAS: Alimentação com boa presença de proteínas, provenientes de frango, carne bovina, porco, ovos, tofu e suplementos proteicos. Os carboidratos são principalmente derivados de arroz, pão, batata, inhame, biscoito de arroz e preparações doces, enquanto os lipídeos estão associados às carnes, ovos, manteiga e preparações de maior densidade energética. Destaca-se o consumo de frutas, vegetais e fibras, como mirtilo, manga, uva, maracujá, tomate, rúcula, salsinha, inhame e psyllium.

Alimentação Saudáveis:

MVCL: Os relatos alimentares indicam uma dieta predominantemente composta por carboidratos, provenientes principalmente de arroz, macarrão, pão, cuscuz, batata e produtos de confeitaria, além de proteínas oriundas de carnes bovina, suína e de frango, ovos e laticínios. Observa-se também consumo frequente de lipídeos, especialmente por meio de frituras, queijos, requeijão e carnes. Alimentos de origem vegetal aparecem em menor variedade, destacando-se arroz, feijão, milho e batata.

BVM: presença frequente de carboidratos (arroz, pão, tapioca, mandioca, mandioquinha, farofa e massas), proteínas (frango, carne bovina, linguiça, ovos, presunto e queijos) e lipídeos, principalmente provenientes de carnes, queijos, preparações fritas e alimentos ultraprocessados. Também há consumo expressivo de frutas e vegetais, incluindo morango, tomate, pepino, cenoura, couve, maracujá, limão e açaí.

SSFS/CASS: observa-se uma alimentação com predomínio de carboidratos, principalmente provenientes de arroz, pão francês, macarrão, cuscuz, bolos, biscoitos, doces e massas. Há consumo frequente de proteínas de origem animal, especialmente carne bovina e suína, linguiça, calabresa, ovos, presunto, mortadela e queijos, além de lipídeos provenientes de carnes, margarina, frituras, embutidos e preparações ultraprocessadas. O consumo de frutas e vegetais é representado principalmente por banana, tomate, cenoura, beterraba e alface.

SEBA: alimentação composta principalmente por carboidratos, provenientes de arroz, pão, tapioca, macarrão, bolos, pipoca e doces, associada a fontes de proteínas como carne moída, frango, linguiça, ovos, peito de peru, queijos e leite. Há também consumo relevante de lipídeos, especialmente por meio de queijos, linguiça, frituras, castanhas, amendoim e alimentos ultraprocessados. O consumo de vegetais e frutas inclui abobrinha, cebola, cenoura, repolho, milho, couve, beterraba, tomate, maçã e morango.

MSM: observa-se uma alimentação com presença expressiva de carboidratos, provenientes de arroz, pão, macarrão, polenta, cuscuz, cereais, balas e produtos açucarados, além de proteínas provenientes principalmente de frango, ovos, feijão, lentilha, queijos e leite. Há também consumo de lipídeos associados a margarina, requeijão, manteiga, maionese, calabresa e alimentos ultraprocessados. Destaca-se

uma maior variedade de frutas, verduras, legumes e sementes, incluindo banana, kiwi, melancia, melão, uva, cenoura, couve, abobrinha, berinjela, milho, ervilha, aveia, linhaça e chia.

MSS: observa-se uma alimentação com predomínio de carboidratos, principalmente provenientes de arroz, feijão, massas, pães, biscoitos, bolos, polenta, batata e produtos açucarados. Há presença frequente de proteínas provenientes de carnes bovina e de frango, peixe, ovos, feijão, queijo, leite e derivados, além de consumo expressivo de lipídeos, especialmente associados a frituras, empanados, queijos, manteiga, requeijão e alimentos ultraprocessados. O consumo de frutas e vegetais é relativamente limitado, com presença principalmente de cenoura, legumes, alface, tomate, espinafre, banana e maracujá.

MB: alimentação variada e com maior presença de frutas, verduras e legumes, além de fontes de carboidratos como arroz, pão, massas, batata, batata-doce, granola, farofa e biscoitos. As proteínas são provenientes principalmente de carnes bovina e de frango, peixe, ovos, queijos, grão-de-bico, feijão e iogurte. Há também consumo de lipídeos, associados a queijos, manteiga, carnes, frituras, amendoim e preparações ultraprocessadas. Frutas, verduras e legumes como mamão, banana, pêssego, morango, tomate, alface, cenoura, abobrinha, pepino e mandioquinha.

MGF: observa-se uma alimentação com predomínio de carboidratos, provenientes principalmente de arroz, pão, panquecas, batata, biscoitos e preparações à base de farinha, além de produtos açucarados. As proteínas são provenientes principalmente de frango, carne bovina, feijão, mortadela, salsicha e hambúrguer, enquanto os lipídeos estão associados principalmente à manteiga, carnes processadas, frituras, batata palha e preparações ultraprocessadas. O consumo de frutas, verduras e legumes é bastante reduzido, com presença principalmente de alface e repolho.