

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE FÍSICA

EVELYN LEMOS DE OLIVEIRA

Técnicas espectroscópicas aplicadas à Oftalmologia: principais ações para diagnóstico e  
terapia

Uberlândia

2021

EVELYN LEMOS DE OLIVEIRA

Técnicas espectroscópicas aplicadas à Oftalmologia: principais ações para diagnóstico e  
terapia

Trabalho de Conclusão de Curso ou  
apresentado ao Instituto de Física da  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em

Área de concentração: Física Médica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Antunes  
Pereira

Uberlândia

2021

EVELYN LEMOS DE OLIVEIRA

Técnicas espectroscópicas aplicada à Oftalmologia: principais ações para diagnóstico e  
terapia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Física da Universidade Federal  
de Uberlândia como requisito parcial para  
obtenção do título de bacharel em

Área de concentração: Física Médica

Uberlândia, 22 de julho de 2021.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira– UFU  
Orientadora

---

Prof. Dr. José Roberto Tozoni – UFU  
Membro

---

Prof. Dr. Mikiya Muramatsu –USP  
Membro

Dedico este trabalho aos meus pais, e às minhas irmãs pelo estímulo, carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois até aqui Ele tem me sustentado, vejo sua bondade e fidelidade ao decorrer do curso me sustentando em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, à minha mãe, Eva Irene de Oliveira Lemos, por todo suporte emocional, por todo incentivo, sendo sempre meu refúgio, ao meu pai, Rebert Borges Lemos, por todo suporte, incentivo e investimento, sempre me guiando e mostrando que os estudos me fariam crescer.

Agradeço às minhas irmãs, Eduarda e Emanuele, por sempre me apoiarem e estarem comigo em todos os momentos.

Agradeço aos meus avós, meus primos (as), meus tios, em destaque tia Régia Gebrim e tio William Gebrim Jr. por todo apoio e incentivo.

Agradeço as amizades feitas no período da graduação e que pretendo levar para vida, realmente foram um dos presentes da UFU: Thays, Daniela, Danyelle e Bruna.

Agradeço o suporte e incentivo de amigos verdadeiros em Araguari, colocados por Deus na minha vida.

Um agradecimento especial à minha orientadora professora Andrea por todos os conselhos, ensinamentos, direções, por cada experiência compartilhada, com certeza fez diferença na minha vida.

Agradeço também o professor Adamo por todo aprendizado no laboratório e todos os conselhos.

Agradeço aos meus professores durante a graduação por todo ensinamento e por serem inspiração profissional.

Agradeço à coordenadora do curso, professora Ana Perini, por toda dedicação aos alunos e sempre estar disposta a nos ajudar, e também agradeço a secretária Dilza.

“Com sabedoria se constrói a casa, e com discernimento se consolida. Pelo conhecimento os seus cômodos se enchem do que é precioso e agradável.”

(BÍBLIA, Provérbios, 24,3,4)

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada análise dos artigos existentes na literatura e a partir destes foram selecionados alguns artigos para destacar a evolução da aplicação das técnicas espectroscópicas na área de Oftalmologia. Para adentrar a essa área iniciamos descrevendo o sistema ocular, componentes, características e doenças associadas. Em seguida discorreu-se sobre as técnicas espectroscópicas. Detalhes das preparações de amostras e métodos de análise dos resultados foram os principais aspectos considerados. Através dos resultados publicados na literatura pode-se observar uma evolução na aplicação das técnicas espectroscópicas quanto aos equipamentos utilizados indicando claramente que houve uma mudança de aparato. Como considerações importantes destacamos a determinação do conteúdo proteico em quase a totalidade dos artigos no que se refere a ambas as técnicas. Com a mesma finalidade de analisar as estruturas dos tecidos oculares, observa-se que, no decorrer dos anos, os artigos analisados possuem abordagens diferentes confirmando o desenvolvimento tecnológico das técnicas espectroscópicas. Também neste trabalho foi realizado um mini roteiro de tratamento de espectros, utilizando o software *Spectragryph*.

**Palavras-chave:** Espectroscopia. Raman. Infravermelho. Transformada de Fourier. Tecidos oculares.

## ABSTRACT

In this work, an analysis of existing articles in the literature was carried out, and from these, some articles were selected to highlight the evolution of the application of spectroscopic techniques in the field of Ophthalmology. To enter this area, we start by describing the ocular system, components, characteristics and associated diseases. Then, the spectroscopic techniques were discussed. Details of sample preparations and result analysis methods were the main aspects considered. Through the results published in the literature, it is possible to observe an evolution in the application of spectroscopic techniques regarding the equipment used, clearly indicating that there was a change of apparatus. As important considerations, we highlight the determination of protein content in almost all articles regarding both techniques. With the same purpose of analyzing the structures of ocular tissues, it is observed that, over the years, the articles analyzed have different approaches, confirming the technological development of spectroscopic techniques. Also in this work, a mini script for the treatment of spectra was carried out, using the *Spectragryph* software.

**Keywords:** Spectroscopy. Raman. Infra-red. Fourier transform. Eye tissue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação das 5 camadas da córnea e suas espessuras.	14
Figura 2 -	Partes que constituem a conjuntiva.	16
Figura 3 -	Artigos publicados usando a técnica de espectroscopia Raman de 2006 a janeiro de 2019.	19
Figura 4 -	Mapa mental, metodologia de pesquisa do trabalho.	21
Figura 5 -	Processos moleculares da radiação infravermelha.	22
Figura 6 -	Mudança no momento de dipolo da água devido as vibrações de alongamento assimétrico da ligação O-H.	22
Figura 7 -	Espectro idealizado para uma única transição de comprimento de onda (A) e um espectro obtido experimentalmente (B).	23
Figura 8 -	Ilustração esquemática da absorção no infravermelho médio, espalhamento Rayleigh, espalhamento Stokes, espalhamento anti-Stokes e fluorescência.	25
Figura 9 -	Diagrama esquemático de espectrômetro Raman de laboratório	26
Figura 10 -	Avanços técnicos da espectroscopia Raman	26
Figura 11 -	(a) Mapeamento de pontos, (b) mapeamento de linhas e (c) imagens.	27
Figura 12 -	Esquema de uma configuração da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.	30
Figura 13 -	Espectro Raman de lentes humanas.	41
Figura 14 -	Espectro Raman multicanal de lentes de coelho.	42
Figura 15 -	Espectros Infravermelho originais representativos para o número de onda variando de 3000-2810 e 1860-900 $\text{cm}^{-1}$ das lentes normais e lentes humanas com cataratas imaturas com ou sem glaucoma.	43
Figura 16 -	Contorno de banda de amida I deconvoluída representativa e as bandas componentes individuais mais bem ajustadas da lente normal e lente humana com catarata imatura com ou sem glaucoma.	44
Figura 17 -	Espectro Raman típico e Espectro Residual Padronizado de RGCs de Basset Hounds glaucomatosos.	46

Figura 18 -	Espectros Raman médios e espectros de diferença entre RCGs glaucomatosos e normais.	47
Figura 19 -	Espectro Raman médio de tecidos vítreos: normal, endoftalmite induzida e uveíte induzida.	48
Figura 20 -	Gráfico dos vetores de componentes principais PC1-PC4 para os tecidos vítreos, com as principais características espectrais dos espectros Raman indicados com linhas tracejadas cinza	48
Figura 21 -	Imagem FTIR de proteína total, estruturas de hélice tripla de colágeno e proteína agregada em seções de tecido de córnea não tratadas e seções de tecido da córnea reticuladas com luz ultravioleta e tratamento com riboflavina	50
Figura 22 -	(a) Fotografia de todo o cérebro após sTCE até o córtex parietotemporal esquerdo. (b) Ilustração do cérebro e do trato óptico de camundongo, destacando as projeções ipsilaterais (azul) e contralaterais (laranja) que conectam o cérebro à retina. (c) Exemplo de uma imagem de microscopia de campo claro de uma retina montada plana do grupo mTCE. (d) Espectros Raman médios coletados no núcleo de contusão para mTCE e sTCE em comparação com o grupo simulador. (e) Espectros Raman médio coletados de amostras de retina montadas planas (ambos os olhos), mostrando mTCE e sTCE em comparação com o grupo simulador.	51
Figura 23 -	Agrupamento de espectros Raman da retina para os grupos sTCE (laranja) e simulador (preto) usando um MAO.	52
Figura 24 -	Estruturas químicas e um espectro Raman comum de carotenoides maculares.	53
Figura 25 -	Otimização das condições de aquisição para microscopia Raman de ressonância confocal para distinguir a zeaxantina da luteína.	54
Figura 26 -	Espectro Raman em locais selecionados no mapa de intensidade de carotenoides totais.	55
Figura 27 -	Imagens Z-stack de carotenoides totais em uma retina humana plana.	55

Figura 28 -	Interface do programa Spectragryph, como abrir dados espectrais.	57
Figura 29 -	Espectro Raman.	58
Figura 30 -	Algoritmo de suavização de Savitzky-Golay.	58
Figura 31 -	Correção da linha de base.	59
Figura 32 -	Espectro Raman normalizado.	60
Figura 33 -	Técnica da derivada para o espectro Raman.	61
Figura 34 -	Primeira derivada da curva do espectro Raman.	61
Figura 35 -	Segunda derivada da curva do espectro Raman.	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Regiões de interesse em Espectroscopia.	21
Tabela 2a -	Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.	31
Tabela 2b -	Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.	32
Tabela 2c -	Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.	33
Tabela 3a -	Grupos funcionais e seus intervalos de número de onda	33
Tabela 3b -	Grupos funcionais e seus intervalos de número de onda	
Tabela 4a -	Preparação da lente para análise espectroscópica citada na literatura	36
Tabela 4b -	Preparação do humor aquoso para análise espectroscópica citado na literatura	37
Tabela 4c -	Preparação da córnea para análise espectroscópica citada na literatura	38
Tabela 4d -	Preparação do humor vítreo para análise espectroscópica citado na literatura	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
EP	Epitélio
BM	Membrana de Bowman
SP	Estroma da córnea
DM	Membrana de Descemet
En	Endotélio
DMRI	Degeneração Macular Relacionada a Idade
RD	Retinopatia Diabética
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
PCA	Análise de Componente Principal
LDA	Análise Discriminante Linear
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
SVM	Máquinas de Vetor de Suporte
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
IF	Infravermelho
CCD	Detecores de Dispositivo Acoplado de Carga
PHE	Fenilalanina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
IOP	Pressão Intraocular
RGCs	Células Ganglionares Retinais
TCE	Traumatismo Cranioencefálico
mTCE	Traumatismo Cranioencefálico moderado
sTCE	Traumatismo Cranioencefálico severo
MAO	Mapas auto-organizáveis
IDMAO	Índice Discriminante de Mapa auto-organizáveis

## SUMÁRIO

<b>1 A VISÃO E DOENÇAS ASSOCIADAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 TECIDOS OCULARES</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 CÓRNEA.....	13
1.1.2 RETINA.....	14
1.1.3 CRISTALINO .....	15
<b>1.2 LESÕES E DOENÇAS DOS TECIDOS OCULARES</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 DOENÇAS ACOMETIDAS NA CÓRNEA .....	15
1.2.2 DOENÇAS ACOMETIDAS NA RETINA.....	16
1.2.3 DOENÇAS ACOMETIDAS NO CRISTALINO.....	17
<b>1.3 EXAMES NA OFTALMOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 IMPORTÂNCIA DA ESPECTROSCOPIA PARA DIAGNÓSTICO E TERAPIA DE TECIDOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 ESPECTROSCOPIA APLICADA AOS TECIDOS OCULARES.....	20
<b>2 METODOLOGIAS UTILIZADAS NA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 A ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 A ESPECTROPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3 TABELAS DOS GRUPOS FUNCIONAIS, NÚMERO DE ONDA E MODO DE VIBRAÇÃO, EXTRAÍDAS NA ÍNTEGRA DOS ARTIGOS REFERENCIADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4 EXEMPLOS DE PREPARAÇÕES DE AMOSTRAS PARA ALGUNS TECIDOS OCULARES CITADOS NA LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
<b>3 RESULTADOS PUBLICADOS NA LITERATURA</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 (1980-2000)</b> .....	<b>40</b>
3.1.1 A. BERTOLUZZA, C. FAGNANO, C. CARAMAZZA, E. BARBARESI, S. MANCINI, 1989.....	40
3.1.2 SHANG-YANG LIN, MEI-JANE LI, RUN-CHU LIANG, SHUI-MEI LEE, 1998.....	42
<b>3.2 (2000 – 2021)</b> .....	<b>45</b>
3.2.1 CHRISTINE C. PELLETIER, JAMES L. LAMBERT, and MARK BORCHERT, 2005	
45	
3.2.2 QI WANG, SINISA D. GROZDANIC, MATTHEW M. HARPER, NICOLAS HAMOUCHE, HELGA KECOVA, TATJANA LAZIC E CHENXU YU, 2011 .....	45

3.2.3 EGLAS EMANUEL ROSSI, ANTONIO LUIZ B. PINHEIRO, OVIDIU C. BALTATU, MARCOS TADEU T. PACHECO, LANDULFO SILVEIRA JR., 2011.....	47
3.2.4 VINAY KANSAL , JAYD LUKENCHUK , MARY-MAGDALENE U DODD, MARK HACKETT, VIKAS SHARMA, 2019 .....	49
3.2.5 CARL BANBURY, IAIN STYLES, NEIL EISENSTEIN, ELISA R. ZANIER, GLORIA VEGLIANTE, ANTONIO BELLI, ANN LOGAN E POLA GOLDBERG OPPENHEIMER, 2020 .....	50
3.2.6 BINXING LI, EVAN W. GEORGE, GREGORY T. ROGNON, ARUNA GORUSUPUDI, ARUNKUMAR RANGANATHAN, FU-YEN CHANG, LINJIA SHI, JEANNE M. FREDERICK E PAUL S. BERNSTEIN, 2020. ....	53
<b>4 SOFTWARE.....</b>	<b>57</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1 A VISÃO E DOENÇAS ASSOCIADAS

O ato de ver tem papel determinante em nossas vidas. A visão é um dos cinco sentidos imprescindíveis à manutenção de uma vida saudável. Ela garante, entre outras coisas, a interação entre os indivíduos, como comunicação face a face a partir de gestos e expressões faciais. Fundamental para as atividades diárias dos seres humanos em todas as fases da vida. Para os bebês o ato de ver, reconhecer a família e membros ajuda no desenvolvimento intelectual e social, melhorando também as habilidades motoras, coordenação e equilíbrio.[1] No período da infância à adolescência a visão possibilita o acesso a materiais educacionais e como consequência o alcance para o êxito educacional. Os materiais didáticos e todas as atividades são preparadas para indivíduos com a visão saudável. Em contrapartida, o esforço para permitir o mesmo nível de qualidade de vida as pessoas que têm algum tipo de comprometimento de visão vêm sendo aperfeiçoado, mas ainda são insuficientes.[1] As habilidades sociais são desenvolvidas a partir da visão, promovendo bem-estar e autoestima, pois há maior socialização do indivíduo através da amizade. O desenvolvimento físico, saúde mental e física, são fatores importantes que acontecem com base na participação do indivíduo em atividades esportivas e sociais. Na fase adulta, a visão facilita a contribuição na força de trabalho, e auxilia no gozo em outras áreas da vida que são idealizadas em torno da capacidade de ver, como cultura e esportes. Mais adiante na vida, o ato de ver contribui a manter o contato social e a independência e propicia a melhores cuidados na saúde. Condições oculares que causam deficiência visual e cegueira interferem diretamente na vida dos indivíduos afetando as atividades sociais, saúde física e mental. [1]

O relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta informação de que no mundo problemas oculares e deficiência visual são generalizados e acometem 2,2 bilhões de pessoas. Esses dados também indicam que pelo menos 1 bilhão desses casos poderiam ser evitados e que existem um número de casos relevantes não tratados. Qualquer coisa que resolvermos fazer sem a visão demandaria uma mudança rigorosa em hábitos e decisões. Entretanto, como um dos nossos sentidos mais relevantes ainda ocupa uma posição de preocupação entre as doenças a serem examinadas. [1]

A Física Médica constitui-se como uma área de investigação com caráter interdisciplinar e possui aplicação no âmbito clínico e na pesquisa aplicada, para o diagnóstico e terapia de doenças. Assim, a Física Médica permite conhecimento físico essencial de variadas técnicas terapêuticas e de diagnóstico para caracterizar e desenvolver as tecnologias. [2]

A pesquisa desenvolvida com equipamentos que permitem monitorar o tecido no nível molecular apresenta detalhes da estrutura e função fisiológica que permitirão um avanço e sugestão de tratamento efetivo e ou prevenção, incluindo tratamentos preventivos. As técnicas nanotecnologias não invasivas permitem verificar alterações nos tecidos oculares detectando variações da fisiologia e as alterações mínimas no tecido. [2]

Partindo do exposto acima e considerando a importância da visão para a qualidade de vida do indivíduo este trabalho propõe-se a descrever o sistema ocular e suas peculiaridades e examinar os principais experimentos e resultados da aplicação de técnicas espectroscópicas realizadas para caracterização de doenças oculares. Primeiramente será apresentado um estudo breve sobre os olhos e os principais tecidos oculares, logo em seguida serão abordadas algumas doenças que acometem os tecidos oculares, nas quais podem levar os indivíduos à cegueira. Posteriormente serão citados exemplos de exames clínicos que são utilizados rotineiramente em Oftalmologia. Discorreremos sobre as técnicas espectroscópicas não destrutivas e não invasivas que fornecem características a nível molecular e estrutural dos tecidos. As técnicas de espectroscopia Raman e Infravermelho foram consideradas neste estudo. Foram realizadas análises dos avanços tecnológicos entre os anos de 1980-2000 e 2000-2020, nos estudos aplicados à Oftalmologia com ênfase em doenças que podem causar a cegueira.

## **1.1 TECIDOS OCULARES**

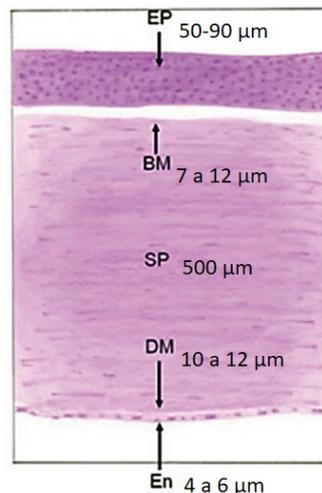
O olho é constituído por três camadas de tecido: o tecido conjuntivo fibroso, uma túnica vascular e a retina. Os tecidos oculares apresentam estruturas complexas e quando não estão saudáveis as afecções alteram a composição inicial dos tecidos modificando suas funções fisiológicas e ópticas. [3][4] A camada externa é composta pela esclera que corresponde a um tecido branco e rígido. O tecido escleral cobre o globo ocular e é o revestimento protetor externo fibroso do olho. As fibras que o compõem são colágenas em forma de feixes compactos de proteínas, sua distância de centro-centro corresponde a 200 nm.[5] Nessa parte dianteira, a camada externa opaca modifica-se na córnea.[6]

### **1.1.1 CÓRNEA**

A córnea é um tecido avascular e transparente [7]. Este tecido está em contato com o ambiente externo, e uma das suas principais funções é assegurar a refração óptica. A sua transparência é que permite a transmissão e refração da luz. A córnea possui cinco camadas, as

quais podem ser observadas na figura 1, uma dessas camadas corresponde ao estroma da córnea, o qual é responsável por 90% da espessura da córnea. A composição desta camada é composta por lamelas entrelaçadas de fibrilas de colágeno. A córnea possui suprimento de oxigênio da atmosfera através do filme lacrimal e por ser avascular não tem suprimento de sangue. [5]

**Figura 1** Representação das 5 camadas da córnea e suas espessuras. EP: epitélio; BM: membrana de Bowman; SP: estroma da córnea; DM: membrana de Descemet; En: endotélio.



Fonte: Adaptada da referência [8].

A camada intermediária de tecido é constituída de três estruturas: íris, o corpo ciliar e a coroide. A íris é composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células pigmentadas, a qual pode ser vista através da córnea. A pupila se encontra em seu orifício central. O corpo ciliar é uma estrutura extensivamente vascularizada. Ele circula o cristalino e acomoda o músculo ciliar, o qual auxilia o ajuste da capacidade de refração do cristalino. A sua vascularização produz o fluido que preenche a parte dianteira do olho. A estrutura coroide é constituída de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, os quais servem como a principal fonte de suprimento sanguíneo para a retina. A coroide possui melanócitos e é amplamente pigmentada, o que auxilia na absorção de luz que chega à retina, desse modo evita a reflexão. [6][8]

### 1.1.2 RETINA

A camada interna é a retina. Ela contém neurônios que são especializadas em capturar a luz e transmite sinais elétricos ao nervo óptico. A parte da retina localizada mais posterior e central é nomeada mácula [6] [8].

### 1.1.3 CRISTALINO

O cristalino é uma lente que possui uma estrutura biconvexa e é quase completamente transparente. Ele está localizado entre a íris e o humor vítreo e é sustentado por finas fibras zonulares. E também possui um acentuado teor de proteína de 60 %. No decorrer da vida as células epiteliais pós-mitóticas na zona equatorial produzem constantemente novas fibras. Diferente de outros tecidos a lente é um sistema fechado em que não há redução de fibras ao longo da vida. As proteínas das fibras das lentes são tão antigas quanto o indivíduo, portanto estão sujeitos a fatores de envelhecimento que acabam ocasionando, por exemplo, a catarata. [6]

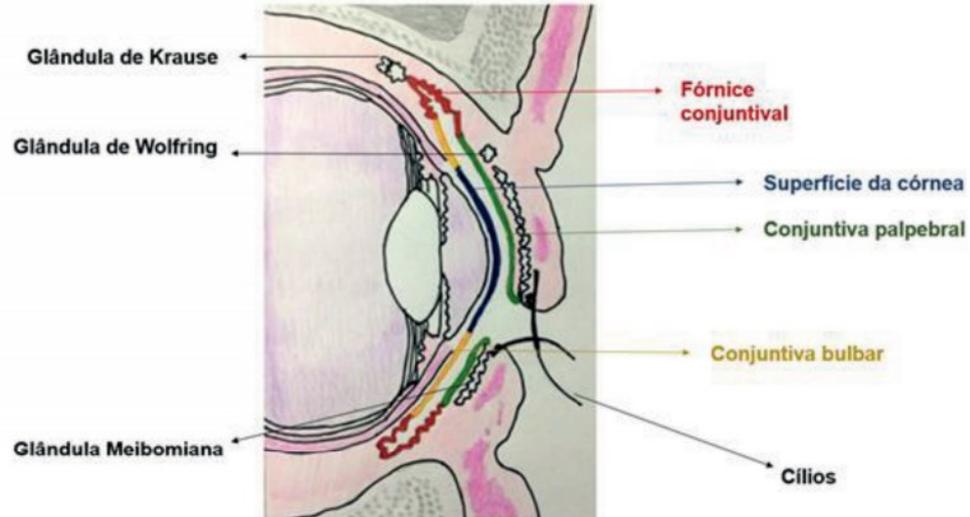
## 1.2 LESÕES E DOENÇAS DOS TECIDOS OCULARES

### 1.2.1 DOENÇAS ACOMETIDAS NA CÓRNEA

Lesões mecânicas, térmicas, químicas e infecções microbianas podem causar danos à córnea gerando opacificação na córnea transparente, perda da visão e cegueira. [6] Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, no mundo há 4,2 milhões de pessoas que sofrem de opacidade na córnea[1]. Um exemplo de disfunção da córnea é a ceratocone que pode ser desenvolvida por fatores genéticos, bioquímicos ou comportamentais, como a ação de friccionar os olhos. [9] A ocorrência da ceratocone varia 20 a 230 por 100.000 habitantes. [10]

A tracoma é uma doença provocada por infecção ocular causada pela bactéria conhecida como *Chlamydia trachomatis*. A inflamação pode progredir para formação de cicatrizes na conjuntiva tarsal superior conhecida também como conjuntiva palpebral, indicado na figura 2 em verde. [11]

**Figura 2** Partes que constituem a conjuntiva.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [8].

Quando a cicatriz distorce a pálpebra superior é desenvolvida a triquíase, que é quando os cílios não estão na direção normal, e isso faz com que um ou mais cílios arranhem a córnea, machucando-a e causando cegueira. Essa doença é uma das principais causas de cegueira no mundo e afeta cerca de 84 milhões de indivíduos, outros 7,6 milhões têm a doença em estágio terminal, entre eles cerca de 1,3 milhões são cegos. Em 1998 a OMS iniciou uma campanha para extinção do tracoma, a Eliminação Global do Tracoma até 2020. [11]

### 1.2.2 DOENÇAS ACOMETIDAS NA RETINA

A Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI) é uma patologia que causa cegueira em indivíduos com mais de 50 anos. Há uma estimativa de que o número de pessoas afetadas por DMRI seja de 196 milhões em 2020 e 288 milhões em 2040. Essa doença apresenta alteração e aglomeração de detritos acelulares amarelos focais no epitélio pigmentado na retina e na membrana de Bruch [12] [13]. Outra doença de grande incidência é Retinopatia Diabética (RD) que é um problema microvascular do diabetes mellitus que é responsável por causar cegueira. A RD afeta no mundo cerca de 35% dos indivíduos com diabetes mellitus. [14]

O nervo óptico quando lesionado pode causar glaucoma. A glaucoma é principal causa de cegueira irreversível no mundo. O dano ocasionado por esta doença que acomete as células

ganglionares da retina e seus axônios causando estreitamento da camada de células ganglionares e a camada de fibra nervosa da retina. [15]

### 1.2.3 DOENÇAS ACOMETIDAS NO CRISTALINO

A catarata é a opacificação progressiva da lente. [8][5][16]. A catarata é considerada 50 % da causa da cegueira no mundo. A lente é transparente devido a desidratação ao meio que é situado, quando ocorre mudança em sua capsula há alteração do estado eletrolítico interferindo no desenvolvimento normal dessa lente, ou seja, se torna opaca. [17]

## 1.3 EXAMES NA OFTALMOLOGIA

A partir dos exames clínicos, as informações coletadas auxiliam para estabelecer o diagnóstico. Os exames são compostos por duas etapas, anamnese e o exame físico. Na anamnese são adquiridos dados subjetivos, através de uma entrevista que o profissional da saúde faz ao paciente. No grego *anamnesis* significa recordar, assim na anamnese clínica o paciente expressa suas sensações. No exame físico o profissional avalia os pacientes através de sinais e sintomas validando os achados na anamnese, também é conhecido como exame objetivo. [18] Na oftalmologia, os exames físicos avaliam as funções visuais e não visuais, como movimento e alinhamento, e anatomias dos olhos. Uma boa visão é consequência de uma via visual neurológica ílesa, um olho com estrutura saudável, e foco apropriado do olho. Deste modo, na oftalmologia são realizados testes clínicos e exames médicos que permitem encontrar estágios de lesão. [19] Os testes diagnósticos são utilizados com o objetivo de avaliar uma propriedade, característica ou uma função de uma determinada amostra, comparando-a com um padrão estabelecido. [20]

O exame físico oftalmológico deve começar com o exame ocular externo que se baseia na inspeção das estruturas mais anteriores do globo ocular. Através do exame ocular externo pode ser identificados desvios oculares, alterações das pálpebras, opacificações da córnea ou modificações da sua morfologia, corpos estranhos, opacificações do cristalino e do vítreo, entre outros. A palpação é realizada somente se existir inflamação ou edema de pálpebra ou da região lacrimal. Após o exame ocular externo é realizado o estudo da movimentação ocular de cada olho e dos dois olhos atuando juntos. Em seguida é feito o exame de acuidade visual e a estimativa do campo visual, no qual é conduzido para cada olho, separadamente. As ametropias (miopia, hipermetropia e astigmatismo) são os motivos frequentes de diminuição da acuidade visual. [21][22]

Para uma melhor inspeção, os instrumentos são utilizados como exames complementares. A seguir estão listados exemplos de exames:

- A retinoscopia permite quantificar eventual vício de refração nos meridianos do olho;
- A refratometria computadorizada com testes de lentes podem facilitar a detecção de vícios na refração;
- A tonometria é um exame que obtém a medida da pressão ocular;
- O estudo bidimensional de diferentes estruturas oculares, de tumores, corpo estranho, entre outros, é feito a partir da ultrassonografia, ecografia ou biometria;
- Para medir a curvatura da córnea utiliza-se a ceratometria, e para medir a espessura da córnea utiliza-se a paquimetria;
- O estudo da circulação da retina e da coroide é feito a partir da angiofluoresceinografia, na qual observa-se o estado dos vasos da retina após a injeção sistêmica de fluoresceína. [23] [24]

A tomografia por coerência óptica (OCT) é um exame que mede a estrutura intraocular em três dimensões, deste modo oferece informações adicionais para um melhor diagnóstico. A OCT permite análise detalhada do disco óptico, camada de fibra nervosa da retina e mácula. E através da angiografia OCT é obtido imagem vascular retinal e coroidal sem a injeção intravenosa. Estudos vem sendo realizados para maiores aplicações da OCT na oftalmologia. [5] [25][26]

A falta de acesso aos exames oftalmológicos devido a status socioeconômico, gênero, e o custo do cuidados com os olhos gera consequências graves em indivíduos que possuem deficiência visual, levando a cegueira. [1]

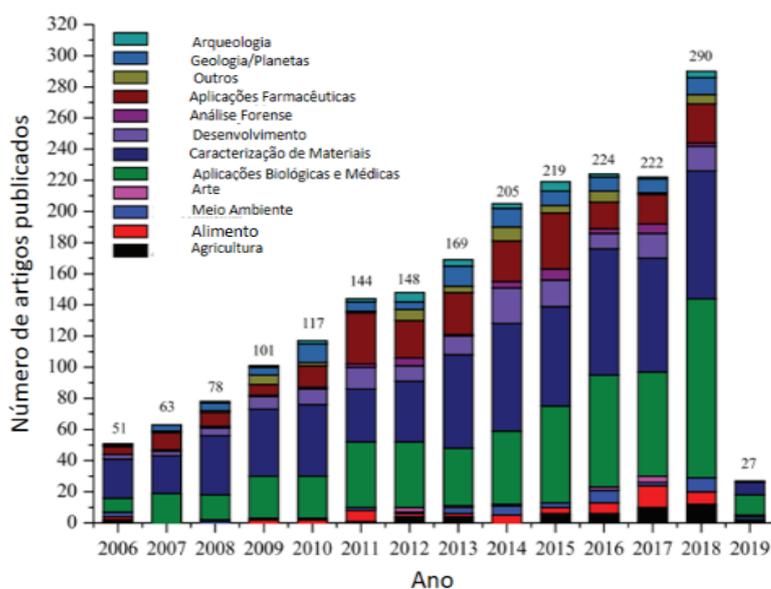
#### **1.4 IMPORTÂNCIA DA ESPECTROSCOPIA PARA DIAGNÓSTICO E TERAPIA DE TECIDOS BIOLÓGICOS**

A espectroscopia é uma das principais técnicas nas aplicações biomédicas, pois auxilia no campo da avaliação clínica fornecendo informações em nível molecular, possibilitando o estudo de grupos funcionais, tipos de ligações químicas e conformações moleculares. [27] A literatura apresenta diferentes estudos de aplicações de técnicas espectroscópicas para a análise de diferentes tecidos biológicos. [28] Através das técnicas espectroscópicas, um tecido biológico pode ser estudado e com os dados espectrais coletados pode-se comparar o

resultado obtido com um espectro padrão, e assim, avaliar se o comportamento espectral foi o esperado. Deste modo, as técnicas espectroscópicas auxiliam no diagnóstico e monitoramento de lesões nos tecidos biológicos.

A espectroscopia Raman é um exemplo de método utilizado para a análise dos tecidos. Os resultados satisfatórios do uso desta técnica têm motivado pesquisadores a ampliarem seu uso em diferentes áreas. De 2006 a janeiro de 2019, um total de 1785 artigos foram publicados Conforme pode ser observado na Figura 1. [29]

**Figura 3.** Artigos publicados usando a técnica de espectroscopia Raman de 2006 a janeiro de 2019.



Fonte: Adaptada da referência [29].

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscopia vibracional simples, reproduzível, não destrutiva para o tecido e utilizada para pequenas quantidades de material (microgramas a nanogramas) com o mínimo de preparação da amostra. Nos espectros vibracionais as bandas espectrais são específicas da molécula e fornecem informações diretas sobre a composição química. [27]

Com os métodos espectroscópicos, um campo consideravelmente amplo de estudos em ciências da vida e medicina tem sido visto nos últimos anos. Acredita-se que em pesquisas relacionadas a técnicas espectroscópicas, tanto o procedimento experimental quanto a caracterização das posições espectrais e suas atribuições com a detecção e definição precisas de pico, são de muita importância. Apesar de investigadores usarem técnicas espectroscópicas

diferentes há uma semelhança na interpretação espectral e este fato possibilita a comparação de espectros de técnicas diferentes utilizando a mesma amostra. [27]

#### 1.4.1 ESPECTROSCOPIA APLICADA AOS TECIDOS OCULARES

A análise da estrutura dos tecidos oculares tem importância no diagnóstico e prevenção de futuras patologias. O olho, comparado com os outros tecidos e órgãos, possui a chamada mídia ótica clara permitindo adquirir repetidamente de maneira não invasiva. [30] Técnicas espectroscópicas são significativas ferramentas para o diagnóstico de tecidos. Estes métodos concedem caracterização a nível molecular e não destrutiva *in vivo*, para biópsia ou *in vitro*. [31]

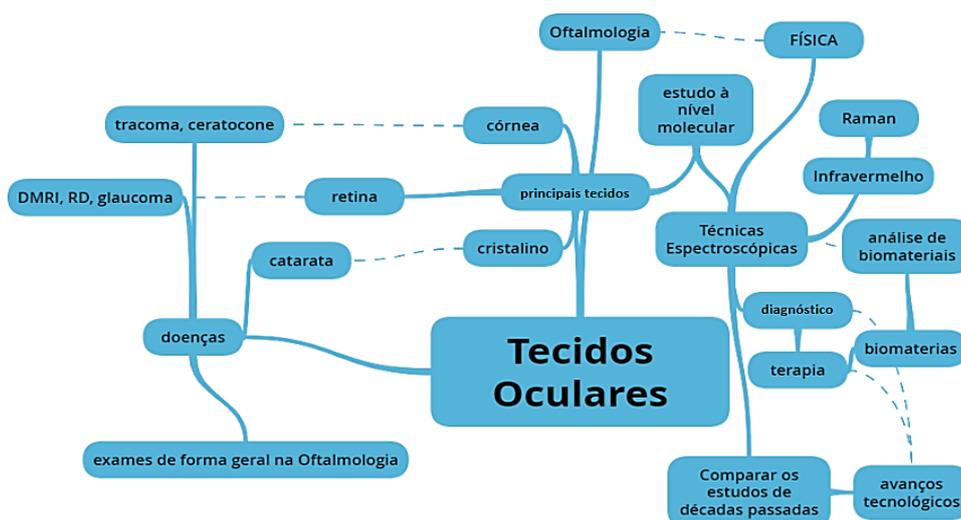
Na pesquisa dos artigos publicados na literatura sobre o tema deste trabalho observamos que as técnicas de Espectroscopia Raman, espectroscopia de infravermelho e espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier são exemplos de técnicas que estão sendo utilizadas para estudos em diagnóstico e terapia em tecidos oculares. [32][33][34]

A crédito de conhecimento, destaca-se que também foram encontradas investigações com biomateriais aplicados ao sistema ocular. As técnicas fornecem um monitoramento da estrutura do biomaterial antes e depois da implantação sem qualquer modificação. Os biomateriais utilizados em próteses oculares são constituídos de polímeros orgânicos. Esses polímeros devem ter propriedades ópticas precisas para não interagir com o ambiente biológico. Este material possui requerimentos de aspectos físicos, químicos e biológicos quanto a biocompatibilidade, os quais podem ser estudados através de técnicas espectroscópicas. [35] [36] A lente intraocular sintética e lentes de contato são exemplos de biomateriais. Estudos mostraram que essas lentes pode ser usada em indivíduos que possuem deficiência visual com o objetivo de preservar e restaurar a visão. [37]

## 2 METODOLOGIAS UTILIZADAS NA LITERATURA

Nesta seção foi realizada uma compilação dos vários métodos propostos na literatura para o diagnóstico e terapia de tecidos oculares. Na figura 4 é ilustrado a metodologia de pesquisa deste projeto.

**Figura 4.** Mapa conceitual, metodologia de pesquisa do trabalho



Fonte: Elaborada pela autora.

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da luz incidente com a substância. Ela determina quais energias e quantidades específicas de luz são absorvidas e posteriormente reemitidas. Os espectros oferecem “impressões digitais” que são atributos de diferentes elementos e compostos químicos. [2]

Na tabela 1 estão listados as regiões de espectros ópticos que são de interesse na espectroscopia.

Tabela 1 – Regiões de interesse em Espectroscopia.

	Faixa de comprimento de onda	Número de onda
Ultravioleta distante	5 Å – 2.000 Å	$2 \times 10^7 \text{ cm}^{-1}$ – $50.000 \text{ cm}^{-1}$
Ultravioleta	2.000 Å – 4.000 Å	$50.000 \text{ cm}^{-1}$ – $25.000 \text{ cm}^{-1}$
Visível	4.000 Å – 7.000 Å	$25.000 \text{ cm}^{-1}$ – $14.300 \text{ cm}^{-1}$

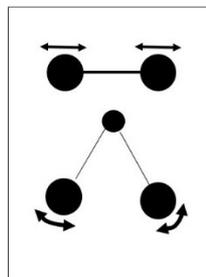
Infravermelho próximo	7.000 Å – 12.000 Å	14.300 $cm^{-1}$ – 8.333 $cm^{-1}$
Infravermelho	1,2 $\mu m$ – 40 $\mu m$	8.333 $cm^{-1}$ – 250 $cm^{-1}$
Infravermelho distante	40 $\mu m$ – 1.000 $\mu m$	250 $cm^{-1}$ – 10 $cm^{-1}$

Fonte: Extraída da referência [2].

Os números de ondas são usados para identificar as linhas espectrais pois são proporcionais às transições de energia envolvidas. Quanto maior o número de onda, maior será a energia da transição que dá origem à linha espectral. [2]

As energias relacionadas às vibrações moleculares, que pode ser observada na Figura 5 [30], se incluem a região infravermelha do espectro eletromagnético. A espectroscopia infravermelha é conhecida como espectroscopia vibracional e é utilizada como técnica de identificação de grupos funcionais em compostos orgânicos.

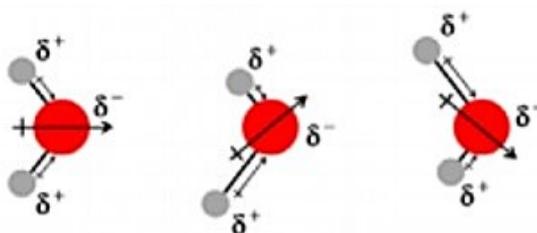
**Figura 5.** Processos moleculares da radiação infravermelha.



Fonte: Adaptada da referência [30]

Ao interagir com a radiação eletromagnética, as moléculas tem um efeito elétrico ou magnético que é motivado pelos componentes elétrico ou magnético da radiação. Na figura 6 [30], é observado que as vibrações de moléculas geram mudanças nos dipolos elétricos que podem interagir com o componente elétrico da radiação eletromagnética.

**Figura 6.** Mudança no momento de dipolo da água devido as vibrações de alongamento assimétrico da ligação O-H.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [30].

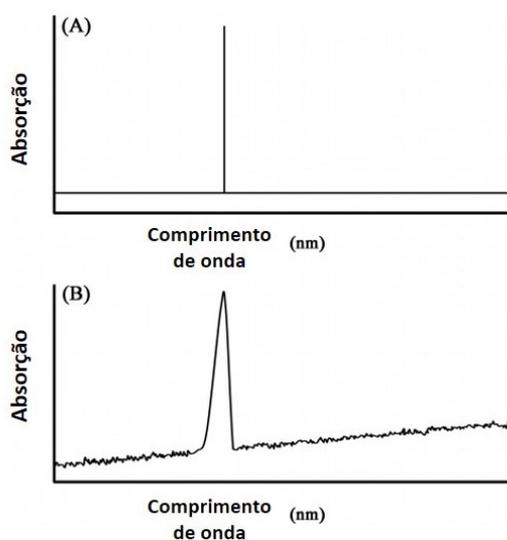
Uma transição entre estados acontece se a energia fornecida pela radiação eletromagnética é igual ao espaço de energia entre os dois estados, ou seja,

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

Na qual  $\Delta E$  é diferença de energia,  $h$  é a constante de Planck, a letra grega  $\nu$  é a frequência,  $c$  é a velocidade da luz e  $\lambda$  é o comprimento de onda.

Isso mostra que a molécula absorve a radiação do comprimento de onda,  $\lambda$  e assim uma linha de absorção nítida aparece neste comprimento de onda, como mostra na figura 7A. As linhas de absorção na prática não são nítidas, mas aparecem como picos bastante amplos como mostra na figura 7B. Na figura 7B também podemos notar que as flutuações na linha e a própria linha de base, que não é horizontal. Fatores instrumentais são responsáveis pela linha de base não horizontal, pois o ruído é a manifestação dos sinais fracos gerados pela eletrônica do instrumento. Para obter uma razoável linha de base horizontal para as amostras basta subtrair o espectro obtido a partir do solvente em que a amostra é dissolvida. [30]

**Figura 7.** Espectro idealizado para uma única transição de comprimento de onda (A) e um espectro obtido experimentalmente (B).



Fonte: Extraída na íntegra da referência [30].

Os picos de absorção são amplos por alguns fatores como:

Fatores instrumentais: as fendas que deixam que a luz incidente incida sobre a amostra e a luz emergente para o detector têm larguras infinitas.

Fatores de amostra: as colisões entre as moléculas em uma amostra influenciam a vibração e movimentos rotacionais das moléculas causando o alargamento.

Alargamento intrínseco: este alargamento surge do princípio de incerteza de Heisenberg, o qual diz que quanto menor for a vida útil de um estado, mais incerta é sua energia. As transições moleculares são finitas e sua energia não é exata. [38]

$$\Delta x \times \Delta p \sim \hbar \quad (3)$$

$$\Delta E \times \Delta t \sim \hbar \quad (4)$$

As expressões matemáticas do princípio de indeterminação de Heisenberg são as equações 3 e 4. A equação 3 apresenta o fato de que as funções de distribuição de posição e momento não podem ser determinadas ao mesmo tempo, elas estão relacionadas entre si. Por causa dos erros experimentais o produto de  $\Delta x$  e  $\Delta p$  é muito maior que  $\hbar$ . Ao definir  $\Delta x$  e  $\Delta p$  como desvios-padrão, o valor mínimo do produto das duas grandezas é  $\frac{\hbar}{2}$ . Deste modo, obtemos as equações 5 e 6. A equação 6 explica o fato de que não podemos obter ao mesmo tempo a energia de uma partícula e o instante de tempo no qual ela possui essa energia. [39]

$$\Delta x \times \Delta p \geq \frac{\hbar}{2} \quad (5)$$

$$\Delta E \times \Delta t \geq \frac{\hbar}{2} \quad (6)$$

Se  $\Delta t$  é o tempo de vida de uma molécula em um estado excitado, a incerteza na energia dos estados é dada por:

$$\Delta E \times \Delta t \geq \frac{h}{4\pi} \quad (7)$$

Onde,  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ .

Quando a radiação eletromagnética interage com uma molécula, três fenômenos podem ocorrer: absorção, transmissão e espalhamento. Os dois primeiros fenômenos estão relacionados ao espectro infravermelho médio, e o último é responsável pelos espectros Raman. [29]

## 2.1 A ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN

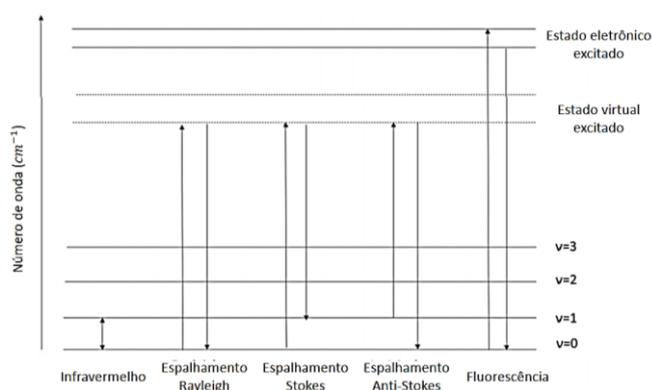
A espectroscopia de espalhamento avalia certas propriedades físicas mensurando a quantidade de luz que uma substância espalha em certos comprimentos de onda. A espectroscopia Raman é umas das aplicações principais da espectroscopia de espalhamento. [40] As intensidades das bandas nos espectros infravermelho e Raman baseiam-se de quão

efetiva é a transferência de energia para a molécula, e este procedimento difere entre as duas técnicas. [29]

Para ocorrer a absorção de infravermelho deve haver uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula. Como consequência, as ligações polares tendem a apresentar sinais maiores do que as ligações não polares. Já no espalhamento Raman, a atividade depende da variação do momento de dipolo induzido, no entanto, ocorre o oposto do infravermelho: as ligações apolares apresentam maiores sinais do que as ligações polares. Por este motivo nas aplicações em ciências da vida as duas técnicas são utilizadas muitas vezes de forma a complementar para o resultado espectroscópico. [29]

A atual fonte de energia da espectroscopia Raman são os lasers. Quando a luz monocromática é focada na amostra, os fótons incidentes vão para o estado virtual e, logo após, os fótons espalhados são medidos como pode ser observado na Figura 8. O estado virtual não é real e não se atribui a nenhum estado eletrônico ou vibracional pré-existente da molécula, mas é gerado no instante da incidência do laser. [29]

**Figura 8.** Ilustração esquemática da absorção no infravermelho médio, espalhamento Rayleigh, espalhamento Stokes, espalhamento anti-Stokes e fluorescência. As setas para cima representam a excitação enquanto as setas para baixo indicam a emissão.



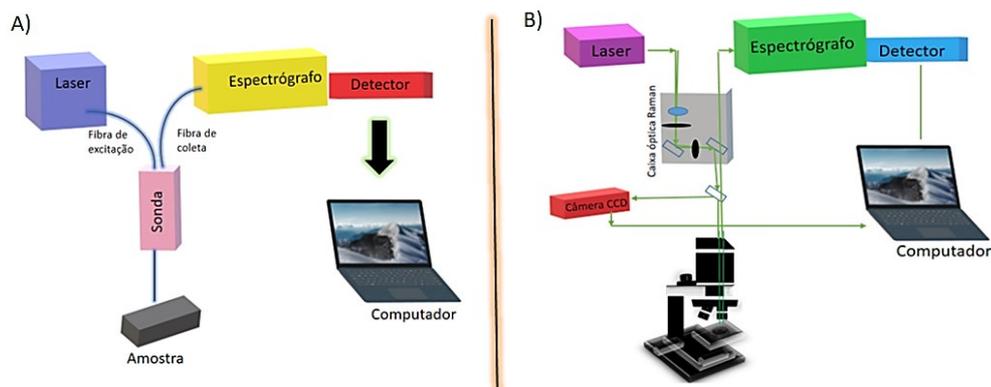
Fonte: Extraída na íntegra da referência. [29]

No espalhamento Rayleigh não há nenhuma diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado, ou seja, é um espalhamento elástico. Quando há uma diferença de energia entre o fóton incidente e espalhado, é chamado de espalhamento inelástico. Se a energia é transferida do fóton para a molécula, o fóton espalhado possui uma energia mais baixa e um comprimento de onda mais longo, e é conhecido como espalhamento de Stokes. Se acontecer o contrário, é conhecido como espalhamento anti-Stokes. (Figura 6) [29]

Na espectroscopia Raman, as amostras são analisadas com pouca ou nenhuma preparação. As amostras podem estar em diferentes modos, como em pó, cristais, comprimidos, cápsulas e líquido, e também por meio de uma camada fina de material de embalagem comum, como plástico ou vidro translúcido ou transparente. [41]

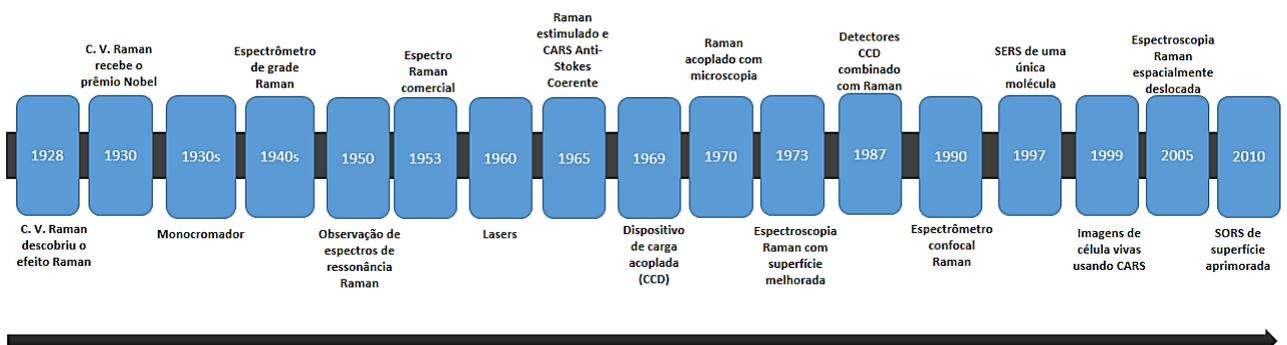
Na figura 9 pode ser visualizado um esquema da instrumentação Raman, como, a montagem de sistema Raman de fibra óptica in vivo e o sistema microscópico Raman. A instrumentação moderna apresenta principalmente um laser como fonte de excitação, um microscópio ou sonda de fibra óptica para interface de amostragem e espectrômetro para detector. [42] A evolução da técnica Raman é representada na figura 10 entre os anos de 1928 a 2010. [42]

**Figura 9** Diagrama esquemático de espectrômetro Raman de laboratório. A) Sistema Raman de fibra óptica in vivo e B) sistema microscópico Raman.



Fonte: Adaptada da referência [42].

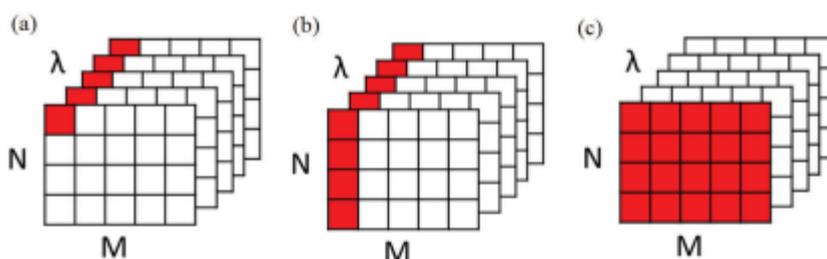
**Figura 10** Avanços técnicos da espectroscopia Raman.



Fonte: Adaptada da referência [42].

As formas de aquisição de dados podem ser por mapeamento de pontos, mapeamento de linhas e imagens. O mapeamento fundamenta-se em obter os espectros através do movimento da amostra em relação ao laser, em contrapartida na técnica de imageamento os espectros são adquiridos sem esse movimento. Na figura 11 pode se visualizar as diferentes formas de aquisição de dados, na qual em vermelho é destacada a quantidade de pixels por comprimentos de onda que podem ser obtidos a cada leitura. [29]

**Figura 11** (a) Mapeamento de pontos, (b) mapeamento de linhas e (c) imagens.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [29]

Na técnica de mapeamento há o mapeamento ponto a ponto ou mapeamento de varredura linear. O mapeamento ponto a ponto também conhecido como mapeamento de ponto, (Figura 11a), o laser é focado em um ponto na amostra e um espectro é obtido neste ponto/pixel, logo a amostra é movida e uma novo espectro é obtido na mesma região e assim por diante. Neste método, o cubo apresenta alta resolução espectral, mas as imagens são de baixa definição. Este é o método mais utilizado e fornece imagens mais detalhadas, apesar de ser o mais demorado. [29] O mapeamento de varredura linear também conhecido como mapeamento de linha (Figura 11b) obtém o espectro de uma linha de pixels: o laser é desfocado para cobrir todos os pixels em uma direção, de maneira que a aquisição de dados é mais rápida do que no método ponto a ponto. Contudo, no caso de que a iluminação do laser é irregular, a resolução espacial da imagem não é tão boa quanto no primeiro método citado. [29]

O método de imagens, o laser, como na varredura linear, também é desfocado, mas ilumina toda a amostra, permitindo que sejam obtidos espectros de toda a região ao mesmo tempo (Figura 11c). Geralmente as técnicas de imagens adquirem os espectros em fatias do cubo, sendo um comprimento de onda do espectro de casa vez, isso torna um método mais rápido quando a faixa espectral a ser estudada é menor que o número de pontos no mapeamento ponto a ponto ou que a raiz quadrada do número de pontos no mapeamento linear. Uma das dificuldades encontradas nos métodos de mapeamento linear e imagem é que o laser é

desfocado, e como o sinal Raman é baixo, é possível o aumento da interferência de fluorescência. [29]

O pré-processamento de dados é uma etapa muito importante. A finalidade desta etapa é eliminar distúrbios que ocorrem durante a análise ou limitar o efeito de fenômenos indesejados associados ao arranjo de amostragem e/ou emissão da amostra. A linha de base, o ruído, as diferenças de escalas, os picos e pixels mortos são os cinco artefatos espectrais principais a serem corrigidos. [29] Os detectores de dispositivo acoplado de carga (CCD) possuem alta sensibilidade, e devido a este fator um dos problemas encontrados é a detecção de raios cósmicos, que afetam os espectros Raman com sinais aleatórios, positivos, unidirecionais e relativamente finos. A presença de picos altera o espectro Raman, limitando o desempenho de métodos multivariados devido a problemas como distorções, variáveis falsas puras e incorreta de componentes nas classificações. Por isso, é importante retirar este sinal antes do desenvolvimento dos modelos. [29]

O ruído nos dados é corrigido utilizando o algoritmo de suavização de Savitzky-Golay, que se fundamenta na aplicação de um filtro polinomial aos dados espectrais. O deslocamento da linha de base pode acontecer devido ao espalhamento ou fluorescência e normalmente não está associado à composição química da amostra, este problema é corrigido usando derivadas ou aplicações de polinômios com mínimos quadrados assimétricos ou mínimos quadrados ponderados. [29]

As diferenças de foco devido a uma superfície não homogênea causam os problemas de diferenças de escalas e podem ser corrigidos usando métodos de normalização. As anomalias nos detectores causam os pixels mortos, que podem ter valores nulos ou perdidos em pixels. Estes pixels mortos, como os picos, distorcem os valores, logo, é importante identificá-los e eliminá-los nesta etapa. A correção deste problema é substituir esses pixels pela mediana ou média dos valores vizinhos. [29]

O tratamento dos dados é da mesma forma independentemente do método de como foram adquiridos. O tratamento é dividido em duas categorias: uni variada e multivariada. Na categoria univariada, apenas um valor é escolhido para a análise de dados. Na forma multivariada, o espectro Raman completo é usado na análise. A forma univariada é o método mais simples e direto que pode ser usado para análise de dados, porém pode apresentar problemas ao lidar com matrizes mais complexas ou maior sobreposição de sinal. Diante disso, é indicado o emprego de dados multivariados e, embora mais complexos, extraem-se informações mais completas. [29] Os dados são sujeitos à análise multivariada usando ferramentas estatísticas, como análise de cluster, análise de componente principal (PCA),

análise discriminante linear (LDA), mínimos quadrados parciais (PLS) e máquinas de vetor de suporte (SVM) para distinguir diferentes grupos de amostra. [42].

Na espectroscopia Raman cada pico indica uma ligação química. Quando há patologia, são mostradas diferentes intensidades do mesmo pico ou pico deslocando com base na conformação da ligação. Os tecidos biológicos são formados pelas mesmas moléculas, mas a quantidade e as interações das moléculas variam entre os tipos de tecido. [43]

## 2.2 A ESPECTROPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de absorção investiga a radiação absorvida em vários comprimentos de onda. Na espectroscopia de absorção, uma radiação eletromagnética é absorvida por uma molécula ou átomos, que passa por uma transição de um estado de baixa energia para um de energia mais alta ou estado excitado. A absorção acontece quando a energia da radiação corresponde à diferença de energia entre dois níveis de energia. Este tipo de espectroscopia fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra. Na ocasião em que uma molécula absorve radiação infravermelha, uma de suas ligações químicas altera sua energia vibracional. Já na absorção de uma radiação na região ultravioleta e no visível ocasiona elétrons de valência da molécula para um nível de energia excitável. Portanto, o tipo de transição depende da energia da radiação eletromagnética. [40]

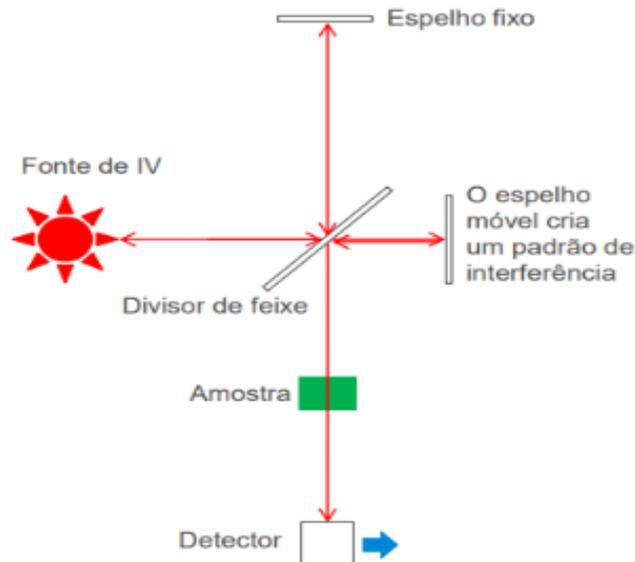
A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é um método que obtém um espectro no infravermelho de absorção, emissão, fotocondutividade ou espalhamento Raman de um sólido, líquido ou um gás. Quando a luz infravermelha é absorvida, pode causar vibrações moleculares e a espectroscopia no infravermelho mensura essa mudança de amplitude. As ligações ativas no infravermelho geram bandas e essas ligações vibram em frequências exclusivas. No espectro, as pequenas variações na altura e na posição da banda possibilitam a diferenciação do composto analisado. No entanto, o espectro infravermelho é comparado com a impressão digital de um composto.[44]

A força da ligação é indicada através do número de onda em que diferentes grupos funcionais absorvem, ou seja, as ligações mais fortes absorvem em maiores números de onda. Como cada grupo funcional absorver em sua frequência específica, isso torna possível esclarecer a estrutura química de um material através de seu espectro no infravermelho. [44]

Na figura 12 um esquema de configuração geral do FTIR é apresentado. A fonte de infravermelho (IR) produz um feixe infravermelho, o qual é a fonte de radiação de banda larga,

em seguida o interferômetro (configurações de espelho) gera um padrão de interferência, local para posicionamento da amostra, e assim o feixe infravermelho a atravessa. Logo após, o detector produz um interferograma e o computador converte o interferograma em espectro. [44]

**Figura 12** Esquema de uma configuração da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [44].

O gráfico obtido pelo detector, o interferograma, é a intensidade de infravermelho em função da posição do espelho, e para ser convertido em espectro, é utilizado o algoritmo da (FTIR), o qual separa as frequências individuais e de absorbância e cria um gráfico da intensidade em função do número de ondas. [44]

Sobre a análise qualitativa da FTIR, os compostos são capazes de ser identificados pelo seu espectro no infravermelho. Estes espectros fornecem informações sobre a estrutura molecular, como a presença de grupo ciano. Os computadores são capazes de fazer uma pesquisa em bancos de dados no infravermelho para identificar compostos comparando os espectros. [44]

Quanto a análise quantitativa, é possível ser aplicada a lei de Beer-Lambert na espectroscopia FTIR, segundo essa lei “A intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente”. Essa lei é expressa pela equação 8. [44][45]

$$I = I_0 \times 10^{-kc} \quad (8)$$

Na qual,  $I$  é a intensidade da luz transmitida,  $I_0$  a intensidade da luz incidente,  $k$  é a constante denominada coeficiente de absorção e  $c$  é a concentração do meio absorvente. [45]

A radiação incidente, na lei de Beer-Lambert, é vista como monocromática, assim, os centros absorventes são independentemente um dos outros e a absorção acontece em um volume de seção transversal uniforme. Sendo assim, a lei de Beer-Lambert é adequada para mais de uma espécie absorvente, desde que não aconteça interação entre as diferentes espécies absorventes, pois a absorvância possui uma propriedade aditiva (se mais de uma espécie absorver em um comprimento de onda de mesmo valor, a absorvância total é dada pelo somatório das absorvâncias de cada espécie absorvente no mesmo comprimento de onda). [46]

Na análise quantitativa, a amostra com a curva de calibração de absorvância em função da concentração de um padrão pode ser comparada. É possível também a análise de misturas, fazendo assim uma quantificação simultânea.[44]

### 2.3 TABELAS DOS GRUPOS FUNCIONAIS, NÚMERO DE ONDA E MODO DE VIBRAÇÃO, EXTRAÍDAS NA ÍNTEGRA DOS ARTIGOS REFERENCIADOS

Na literatura existem tabelas preparadas nos artigos de revisão que informam o grupo funcional, o número de onda e o modo vibracional. Os pesquisadores normalmente utilizam estas tabelas para a análise espectroscópica. Nas tabelas 2a, 2b e 2c estão listados alguns grupos funcionais e suas frequência da banda da técnica espectroscópica Raman.

Tabela 2a- Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.

Atribuição	Modo de vibração	Frequência de banda (cm <sup>-1</sup> )
<b>Estrutura secundária da proteína</b>		
Alongamento esquelético / $\alpha$ -hélice	Alongamento N-C $\alpha$ -C	930 – 950
Amida III / $\beta$ -folha	Banda N-H e C-H	1235 – 1259
Amida III / desordenada	Banda N-H e C-H	1260
Amida III / $\alpha$ -hélice	Banda N-H e C-H	1300 – 1340
Amida I / $\alpha$ -hélice	H-ligado e alongamento C=O	1650 – 1655
Amida I / $\beta$ -folha e $\beta$ -barril	H-ligado e alongamento C=O	1670 – 1680

Fonte: Extraída da referência [47]

Tabela 2b- Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.

<b>Atribuição</b>	<b>Modo de vibração</b>	<b>Frequência de banda (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>Resíduos de aminoácidos</b>		
Conformadores <i>trans</i> e <i>gauche</i>	Alongamento S-S	508 – 545
Conformador <i>gauche</i>	Alongamento C-S	655
Conformadores <i>trans</i>	Alongamento C-S	704
Dupleto de tirosina Fermi	Ligação H do anel indol	835/857
Orientação do triptofano	Ligação H do anel indol	875 – 880
Fenilalanina	Anel fenil	1008/1034
Triptofano	Anel indol	1551 – 1556
Fenilalanina	Anel fenil	1605
Tirosina	Anel indol	1615
<b>RNA e DNA</b>		
Hélice de forma-A	Alongamento O-P-O	813 – 816
Ribose-fosfato	Alongamento C-O e C-C	914 – 925
Marcador B-DNA e Z-DNA	Alongamento simétrico PO <sub>2</sub>	1095
Uracil	Alongamento anel	1135, 1235, 1395
Guanina	Alongamento anel	1174, 1325, 1370
Citosina	Alongamento anel	1245, 1275
Adenina	Alongamento anel	1256, 1514
Timina	Alongamento C=O	1671

Fonte: Extraída da referência [47]

Tabela 2c- Seleção de frequências de banda Raman de algumas atribuições de interesses biológicos.

Atribuição	Modos de vibração	Frequência de banda (cm <sup>-1</sup> )
<b>Açúcares</b>		
β-D-glucose, D-(+) dextrose	Alongamento C-O e C-C	1000 – 1200
Glicogênio	Alongamento C-O do CH <sub>2</sub> OH de carboidratos	1025, 1047, 1155
GlcNAc e GalNAc	NH <sub>2</sub> balançando	1267
β-D-glucose, D-(+) dextrose	Deformações de CH <sub>2</sub> e CH <sub>2</sub> OH	1300 – 1500
<b>Lipídios</b>		
Comprimento da cadeia de ácido graxo	CH <sub>2</sub> balançando	891, 908
Fosfolipídios	Alongamento simétrico-PO <sub>2</sub>	1080
Fosfolipídios	Alongamento assimétrico-PO <sub>2</sub>	1259
Ácidos graxos saturados não ramificados	Alongamento C-C	1296
Cadeias acil de lipídios	Alongamento C=C	1660
Ligações lipídicas saturadas	Alongamento C-H	2873, 2931, 3961
Ligações lipídicas insaturadas	Alongamento assimétrico CH <sub>2</sub>	2888, 2926
	Alongamento H-C=C	3009

Fonte: Extraída da referência [47]

Nas tabelas 3a e 3b, estão listados os grupos funcionais com seus respectivos comprimentos de onda. [44]

Tabela 3a- Grupos funcionais e seus intervalos de número de onda.

Ligação	Tipo de vibração	Número de onda Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	
<b>C-H</b>	Alcano (estiramento)	3000 – 2850	
	-CH <sub>3</sub> (deformação)	1450 & 1375	
	-CH <sub>2</sub> (deformação)	1465	
	Alceno Estiramento	3100 – 3000	
	Aromático (deformação fora do plano)	(estiramento)	1000 - 650 3150 – 3050
		Alcino (deformação fora do plano)	900 – 600
	Aldeído (estiramento)	~3300	

Fonte: Extraída da referência [44].

Tabela 3b- Grupos funcionais e seus intervalos de número de onda.

<b>Ligação</b>	<b>Tipo de vibração</b>	<b>Número de onda Intervalo (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>C=C</b>	Alceno	1680 – 1600
	Aromático	1600 & 1475
<b>C≡C</b>	Alcino	2250 - 2100
<b>C=O</b>	Aldeído	1740 – 1720
	Cetona	1725 – 1705
	Ácido carboxílico	1725 – 1700
	Éster	1750 – 1730
	Amida	1680 – 1630
	Anidrido	1810 - 1760
<b>C-O</b>	Álcoois, ésteres, éteres	1300 - 1000
	Ácidos carboxílicos, anidridos	
<b>O-H</b>	Álcoois, fenóis, livre de ligação de hidrogênio	3650 – 3600 3400 – 3200
	ácidos carboxílicos	3400 - 2400
<b>N-H</b>	Primário e secundário	3500 – 3100
	Aminas e amidas (estiramento)	1640 – 1550
	(ligação)	
<b>C-N</b>	Aminas	1350 – 1000
<b>C=N</b>	Iminas e oximas	1690 – 1640

Fonte: Extraída da referência [44]

### 2.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS

A espectroscopia Raman e de infravermelho examinam vibrações moleculares associadas a ligações químicas em uma amostra para obter dados sobre estrutura molecular,

composição e interações moleculares. As duas técnicas citadas possuem espectros similares. Uma vantagem que a técnica de espectroscopia Raman tem sobre a infravermelho no diagnóstico de tecidos consiste em que a água é pouco absorvida pois tem polaridade simétrica, já na espectroscopia de infravermelho, é bastante absorvida. [43]

Outra vantagem que a espectroscopia Raman tem sobre a infravermelho é que seus espectros possuem menos bandas que os espectros no infravermelho. Deste modo, a técnica espectroscópica Raman tem menos consequências com a presença de bandas de sobretons e combinação. Assim, as medidas quantitativas tornam-se mais simples, no entanto, o alto custo dos equipamentos relacionados a equipamentos de absorção faz com que isso não aconteça. Os lasers de diodo são responsáveis pelo alto custo de espectrômetros Raman. [48][49]

Na espectroscopia Raman, o uso do detector CCD e o laser de diodo, fizeram com que esta técnica espectroscópica fosse utilizada para pesquisas e monitoramento de processos ou reações. Um sistema óptico junto a um detector CCD possibilita a aquisição de diversos espectros em curto espaço de tempo, o que permite a detecção de produtos em monitoramento. [50]

A espectroscopia Raman é uma técnica antiga, mas as aplicações do seu uso em ciências da vida e medicina têm se intensificado e também equipamentos tem recebido mudanças e aprimoramentos em seus componentes. [43]

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica versátil, simples e confiável para estudar gases, líquidos e sólidos, podendo analisar diversas amostras de tamanhos diferentes com pouco ou nenhum preparo. A análise pode ser quantitativa ou qualitativa. Esta técnica é mais utilizada para identificar estruturas, pois os grupos funcionais produzem bandas características em termos de intensidade e frequência. Porém, para esta técnica, a molécula deve reagir à radiação infravermelha. [44]

## **2.4 EXEMPLOS DE PREPARAÇÕES DE AMOSTRAS PARA ALGUNS TECIDOS OCULARES CITADOS NA LITERATURA**

A preparação de amostra é um passo importante em um trabalho, e ela se diferencia de acordo com o objetivo, tecido a ser analisado e a técnica utilizada. Nesta seção, é apresentado um apanhado na literatura de como as amostras de alguns tecidos oculares foram preparadas (Tabelas 4a, 4b, 4c e 4d).

Tabela 4a- Preparação da lente para análise espectroscópica citada na literatura.

<b>Tecido ocular</b>	<b>Preparação da amostra</b>	<b>Técnica espectroscópica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Lente</b>	<p>A lente foi fixada em 3,6% de formaldeído tamponado com tampão fosfato-salino (PBS) por 4 semanas.</p> <p>Meias lentes foram cortadas com lâmina de barbear e colocadas paralelamente em fatias de cerca de 0,5 mm de espessura e armazenadas em PBS.</p> <p>Córtex superficial analisado a cerca de 0,15 mm. Córtex profundo analisado a cerca de 0,7 mm. Núcleo analisado a cerca de 4 mm abaixo da cápsula do cristalino equatorial.</p>	Microspectroscopia confocal Raman	Análise da diferença em perfis de proteína de três regiões da lente.
<b>Lente</b>	<p>Os olhos de ratos foram enucleados sob anestesia com dose letal de pentobarbital.</p> <p>A lente foi gentilmente excisada em solução de meio de lente tamponada com o agente tamponante de ácido sulfônico zwitteriônico (HEPES) e transferida para a célula de cubeta cheia com meio de lente com tampão HEPES onde foi colocada horizontalmente no fundo da célula.</p>	Espectroscopia Raman	Investigar lentes diabéticas dos ratos.

Fonte: Extraída das referências [51] [52].

Tabela 4b- Preparação do humor aquoso para análise espectroscópica citado na literatura.

<b>Tecido ocular</b>	<b>Preparação da amostra</b>	<b>Técnica espectroscópica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Humor aquoso</b>	<p>Amostras de humor aquoso humano foram coletadas de pacientes submetidos à cirurgia de catarata.</p> <p>As amostras foram armazenadas a - 30° C até o dia da análise, quando foram descongelados e agitados em vórtex. As amostras foram mantidas no gelo até uma hora antes da medição, quando puderam atingir a temperatura ambiente.</p> <p>Dois tipos de conjuntos da amostra, o referencial, as amostras normais e as amostras que foram aumentadas com glicose para representar as concentrações que podem ser encontradas em diabetes.</p>	Espectroscopia Raman	Medir concentração de glicose de amostras de humor aquoso humano <i>in vitro</i> de paciente com catarata.

Fonte: Extraída da referência [53].

Tabela 4c- Preparação da córnea para análise espectroscópica citada na literatura.

Tecido ocular	Preparação da amostra	Técnica espectroscópica	Objetivo
<b>Córnea</b>	<p>A córnea foi congelada por imersão em isopentano resfriado com nitrogênio líquido para evitar artefatos químicos. Foram cortadas seções de 10 µm de espessura da córnea com um crio-micrótomo a 18° C, e foram derretidas no substrato.</p> <p>Uma seção foi derretida em um substrato de CaF<sub>2</sub> para a análise de FTIR, e outra seção foi derretida em uma lâmina de microscópio de vidro regular para análise histológica de hematoxilina e eosina (H&amp;E).</p> <p>As seções de tecido foram secar ao ar em uma ambiente de laboratório em temperatura ambiente (~ 23,5° C) e analisadas usando FTIR imediatamente ou coradas com H&amp;E imediatamente. [54]</p>	Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier	Investigar a separação temporal e espacial das ligações de colágeno da córnea que sustentam o sucesso do procedimento de reticulação de colágeno da córnea (CCL).

Fonte: Extraída da referência [54].

Tabela 4d- Preparação do humor vítreo para análise espectroscópica citado na literatura.

Tecido ocular	Preparação da amostra	Técnica espectroscópica	Objetivo
<b>Humor vítreo</b>	<p>Vinte e dois coelhos albinos foram separados em dois grupos: G1, dez animais com indução de endoftalmite por injeção intravítrea de <i>S. aureus</i>; G2, dez animais com indução de uveíte por injeção intravítrea de lipopolissacarídeos (LPS) de <i>E. coli</i>.</p> <p>Vinte e quatro horas após a injeção intravítrea, os coelhos foram sacrificados por injeção intracardíaca de 5,0 ml de tionembatal. Foi realizada a aspiração do humor vítreo através de uma agulha de insulina.</p> <p>A dissecação do vítreo foi realizada em uma ambiente estéril. Cada amostra de vítreo foi colocada em uma cubeta de quartzo, e assim foram utilizadas para as medidas no espectrômetro Raman.</p>	Espectroscopia Raman	Diferenciação de uveíte e endoftalmite em tecidos vítreos <i>in vitro</i> de coelhos

Fonte: Extraída da referência [55].

### 3 RESULTADOS PUBLICADOS NA LITERATURA

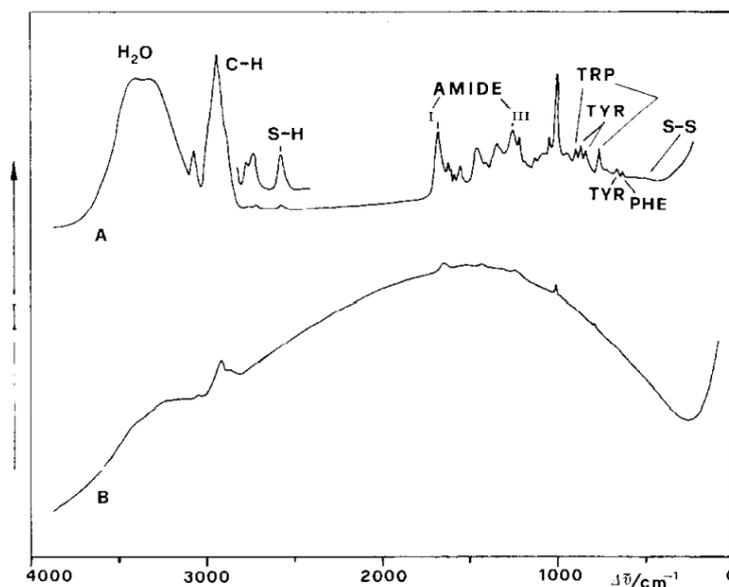
#### 3.1 (1980-2000)

3.1.1 A. BERTOLUZZA, C. FAGNANO, C. CARAMAZZA, E. BARBARESI, S. MANCINI, 1989

Neste trabalho os autores discutem sobre a aplicação da técnica espectroscópica multicanal Raman no estudo da estrutura de lentes naturais e artificiais. As lentes naturais se diferenciam de acordo com a espécie animal. Por exemplo, as lentes de aves e répteis contêm uma proteína conhecida como  $\delta$ -cristalino, na qual é ausente nos mamíferos, e as lentes dos mamíferos são semelhantes em relação a porção proteica e possuem três frações de proteína solúvel em água e uma fração insolúvel em água. A fração solúvel em água comporta as proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -cristalino. A fração  $\alpha$  é rica em fenilalanina (PHE), a fração  $\beta$  é mais abundante em triptofano (TRP) e por fim a fração  $\gamma$  é rica em tirosina (TYR), no qual tem o maior teor de grupos sulfidril (-SH). [35]

A idade e a catarata produzem modificações na intensidade relativa das bandas características Raman dos grupos laterais aromáticos (TRP:  $760\text{ cm}^{-1}$ ; TYR:  $644\text{ cm}^{-1}$ ; PHE:  $624\text{ cm}^{-1}$ ), diminuição na intensidade dos grupos sulfidril (em  $2580\text{ cm}^{-1}$ ), e um aumento da intensidade dos grupos S-S (em  $508\text{ cm}^{-1}$ ). Já as amidas I (em  $1672\text{ cm}^{-1}$ ) e III (em  $1240\text{ cm}^{-1}$ ) não mudaram notavelmente. Também foi detectado uma mudança na intensidade relativa das frequências de alongamento da água. Na figura 13 pode ser visualizado um espectro Raman obtido em lentes humanas normais intactas isoladas e um espectro de uma lente humana com catarata na região cortical. [35]

**Figura 13** Espectro Raman de lentes humanas: (A) Intacta, isolada e lentes normais, região cortical (marcador de banda diagnóstico de catarata é mostrado). (B) Intacta, isolada e lente com catarata, região cortical.



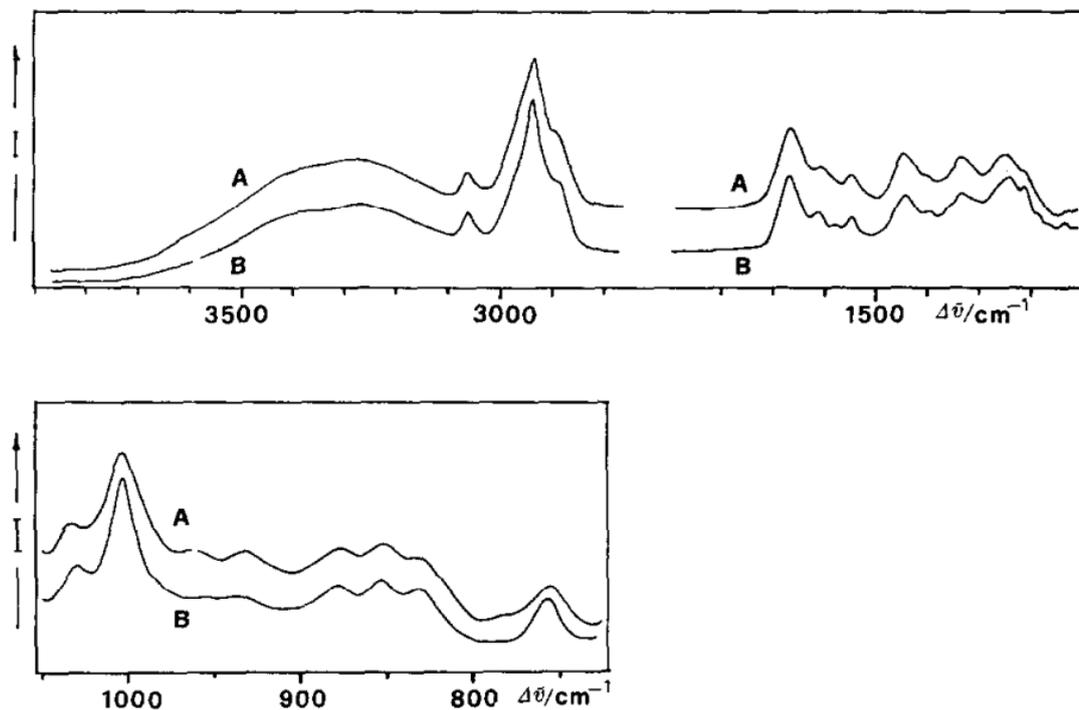
Fonte: Extraída na íntegra da referência [35]

Segundo os autores, estes estudos demonstram a possibilidade de usar a espectroscopia Raman para monitorar as mudanças nas estruturas de uma lente humana normal em processo de formação de catarata e prova a evidência de que a espectroscopia Raman é uma ferramenta importante no diagnóstico de catarata à nível molecular. [35]

Os investigadores trabalharam na utilização de detectores multicanais junto à técnica de espectroscopia Raman para diagnosticar catarata, pois o espectro, deste modo, é obtido em um curto tempo com uma luz de baixa potência para evitar danos no tecido ocular. [35]

No experimento foi utilizado lentes normais de coelhos, usando uma linha de excitação contínua de 488 nm de um laser de  $\text{Ar}^+$ , com uma potência de 2 mW e tempo de exposição de 0,5 s. Na figura 14, pode ser visualizado também o espectro da lente de coelho intacta isolada e os dois espectros mostram o marcador de banda diagnóstico de assinatura de pré catarata. [35]

**Figura 14** Espectro Raman multicanal de lentes de coelho: (A) In situ e in vivo, região nuclear. (B) Amostra isolada, região nuclear.



Extraída na íntegra da referência [35].

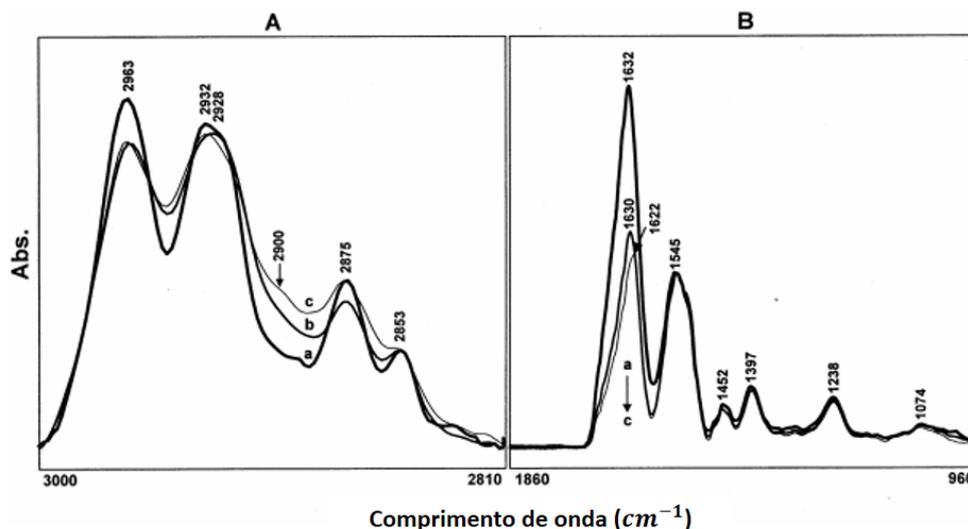
Portanto, o desenvolvimento da espectroscopia de multicanal Raman é uma técnica adequada para análise estrutural *in situ* e *in vivo* e vai além de estudar as lentes humanas com relação idade e formação de catarata, segundo os autores, pode ser estendido para estudar tecidos oculares como a córnea. [35]

### 3.1.2 SHANG-YANG LIN, MEI-JANE LI, RUN-CHU LIANG, SHUI-MEI LEE, 1998

Nestes estudo foram investigadas as estruturas de lipídeos e proteína e as composições de amostras de lentes humanas, utilizando a FTIR, com métodos de segunda derivada, deconvolução e ajuste de curva. O objetivo é esclarecer a formação de catarata induzida por glaucoma nas lentes dos olhos, por isso foram analisadas as alterações nas estruturas de lipídios e proteínas do cristalino humano de pacientes imaturos com catarata com ou sem glaucoma. Na literatura é relatada que a pressão intraocular (IOP) induz glaucoma. Segundo os autores, a alta IOP e glaucoma podem mudar as estrutura secundárias de proteínas da cápsula do cristalino com catarata imatura e modificando o transporte iônico através da cápsula do cristalino

deformada, e assim estimula formação de catarata. Na figura 15 podem ser visualizados os espectros infravermelho originais representativos das lentes normais e lentes humana com cataratas imaturas com glaucoma e sem glaucoma. [56]

**Figura 15** Espectros Infravermelho originais representativos para o número de onda variando de 3000-2810  $\text{cm}^{-1}$  e 1860-900  $\text{cm}^{-1}$  das lentes normais e lentes humanas com cataratas imaturas com ou sem glaucoma. a, lente normal; b, lente com catarata imatura sem qualquer doença; c, lente com catarata imatura com glaucoma.



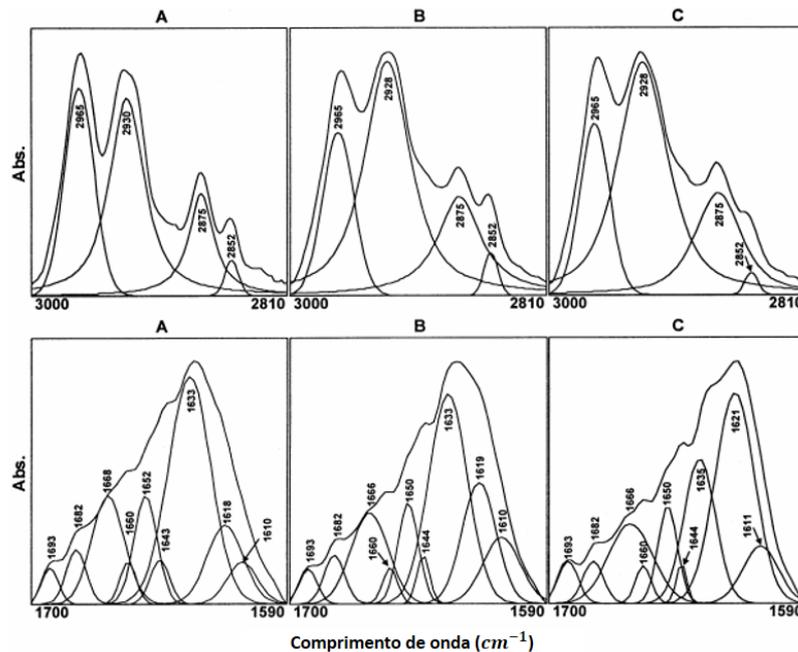
Fonte: Extraída na íntegra da referência [56].

Após as medidas, os resultados mostraram que o espectro infravermelho de lentes glaucomatosas apresentou como um ombro apenas em 2.853  $\text{cm}^{-1}$ , assim sendo, a composição da banda de alongamento  $\text{CH}_2$  simétrica em 2.853 (2.852)  $\text{cm}^{-1}$  diminuiu mais em lentes glaucomatosas para apenas metade do normal e lentes cataratas imaturas. [56]

A formação da banda de assimétrica de  $\text{CH}_3$  a 2.965  $\text{cm}^{-1}$  para lentes normais diminuiu de 32 % para 20 % para lentes com catarata imaturas com glaucoma e lentes com catarata sem glaucoma. [56]

O pico máximo da banda de amida I para os espectros infravermelho da lente normal, lentes cataratas imaturas sem complicações ou lentes glaucomatosas estão localizados respectivamente em 1.632, 1.630 ou 1.622  $\text{cm}^{-1}$ , conforme a figura 16. [56]

**Figura 16** Contorno de banda de amida I deconvoluída representativa e as bandas componentes individuais mais bem ajustadas da lente normal e lente humana com catarata imatura com ou sem glaucoma; A, lente normal; B, lente catarata imatura sem qualquer doença; C, lente com catarata imatura com glaucoma.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [56].

A IOP elevada pode estar relacionada as mudanças degenerativas nos canais de saídas pra aumentar o risco de glaucoma. A IOP mais alta do glaucoma pode modificar a conformação estrutural da cápsula do cristalino e do cristalino nos olhos causando danos no transporte de íons. Este dano de transporte pode gerar a opacificação do cristalino, portanto a formação de catarata está ligada à IOP elevada. O glaucoma e IOP altos podem realimentar o controle para a formação de catarata. [56]

Portanto, os autores concluíram que as alternâncias nas estruturas dos lípidios e proteínas do cristalino desempenharam um papel importante na formação de catarata humana, principalmente quando o cristalino glaucomatoso era mais pronunciado. [56]

### 3.2 (2000 – 2021)

#### 3.2.1 CHRISTINE C. PELLETIER, JAMES L. LAMBERT, and MARK BORCHERT, 2005

Neste trabalho o objetivo dos investigadores era determinar as concentrações de glicose de amostras de humor aquoso *in vitro* de pacientes acometidos de catarata. As concentrações de glicose foram obtidas usando a técnica de espectroscopia Raman com o comprimento de onda no valor de 785 nm e o método de calibração de mínimos quadrados parciais. A energia de excitação utilizada para obter os espectros correspondeu a 100 mW por 150 s, este valor é maior do que pode ser utilizada *in vitro*, com a finalidade de diminuir a contribuição dos modelos PLS para a incerteza da previsão. As soluções eram compostas de glicose, bicarbonato, lactato, ureia e ascorbato. [53]

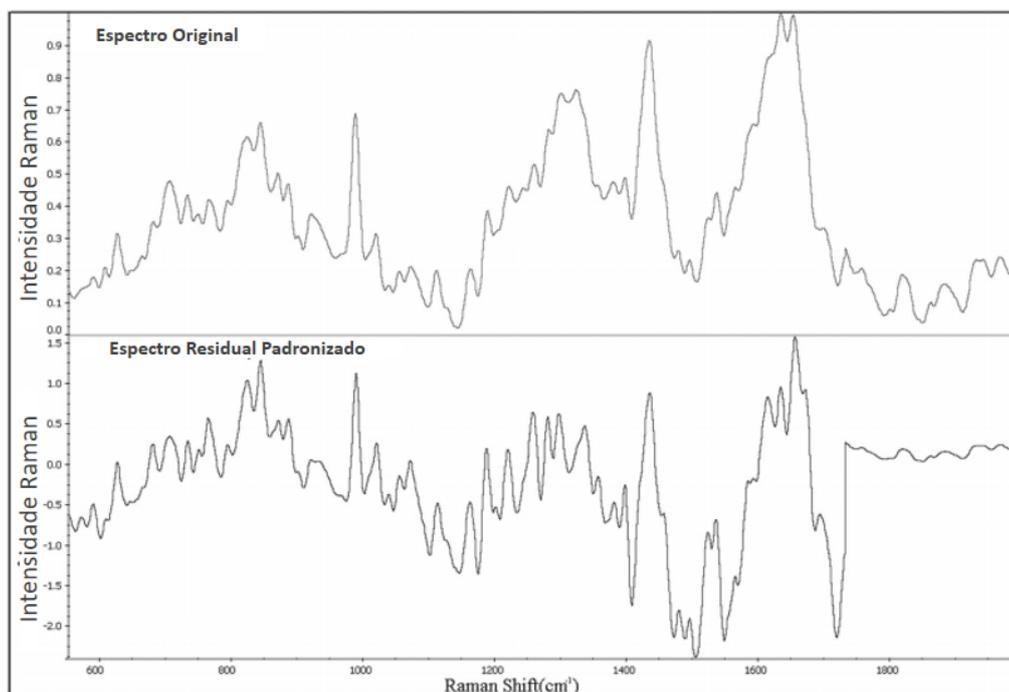
Foram obtidos resultados coletando espectros de energia inferior simultaneamente, dos quais dezessete amostras de humor aquoso humano contendo 38-775 mg/dl de glicose apresentaram um erro quadrático médio de 22 mg/dl, coeficiente de determinação de 0,989 e viés de 6 mg/dl. E também foram obtidos resultados semelhantes com os dados espectrais coletados separadamente para amostras de humor aquoso humano e amostras de calibração, dos quais foram 10 amostras de humor aquoso humano calibradas em 25 soluções medidas 3,6 semanas antes e mostraram um erro quadrático médio de 23 mg/dl coeficiente de determinação de 0,992 e viés de 9 mg/dl. [53]

Este trabalho apresenta resultados que mostram um progresso em direção a determinação dos níveis de glicose em humor aquoso derivado de paciente utilizando soluções de calibração de “humor aquoso artificial” derivadas de laboratório. [53]

#### 3.2.2 QI WANG, SINISA D. GROZDANIC, MATTHEW M. HARPER, NICOLAS HAMOUCHE, HELGA KECOVA, TATJANA LAZIC E CHENXU YU, 2011

Neste trabalho, a espectroscopia Raman foi utilizada para detecção de alterações glaucomatosas *in vitro*. Nesta pesquisa foram usadas amostras de retinas de cães com glaucoma hereditário e cão saudáveis. Os espectros Raman obtidos foram sujeitos à análise discriminante multivariada com um algoritmo de máquina de vetores de suporte, e um modelo de classificação foi desenvolvido para distinguir tecidos sadios e não sadios. A figura 17 mostra a análise espectroscópica de 105 células ganglionares retiniais (RGCs) de cães glaucomatosos. [57]

**Figura 17** Espectro Raman típico e Espectro Residual Padronizado de RGCs de Basset Hounds glaucomatosos.

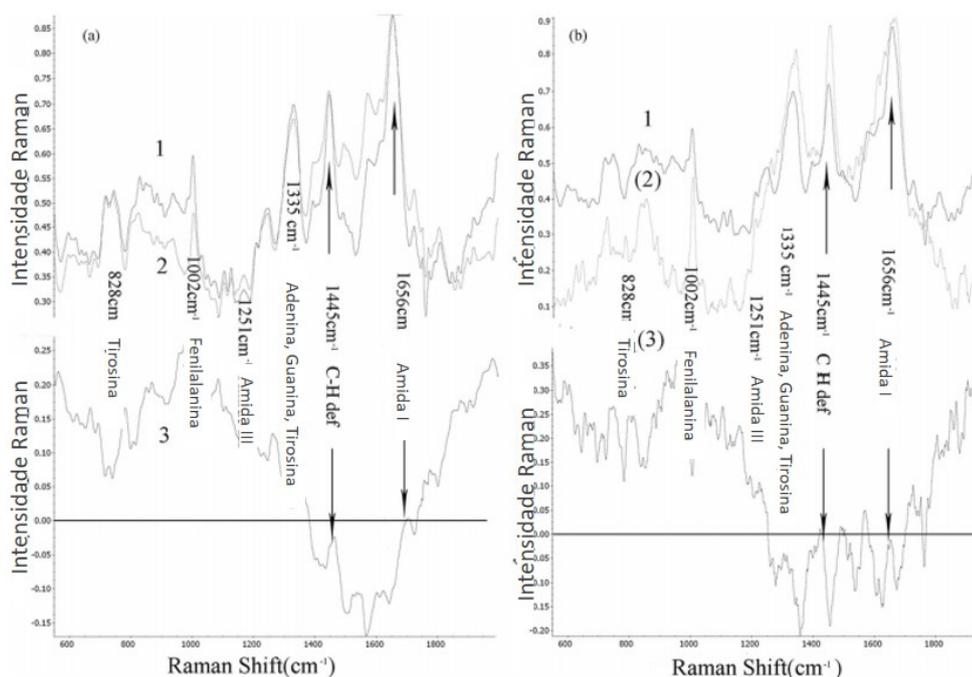


Fonte: Extraída na íntegra da referência [57].

Na figura 18 podem ser visualizados o espectro Raman e espectro de diferença entre os RGCs sadios e não sadios. O número de ondas e as alterações de intensidade nessas bandas Raman de importância biológica foram indicativos de alterações na estrutura secundária e variações em ambientes locais de proteínas intracelulares, bem como de DNAs, que determinam as características dos tecidos glaucomatosos. [57]

Como discussão os autores verificaram no espectro as diferenças nos picos da amida III e mostraram as alterações na concentração geral de proteínas totais. A composição das proteínas similarmente apresentam algumas distinções significativas como evidenciado pelas bandas Raman de vários aminoácidos, em 800 a 1.200  $\text{cm}^{-1}$ . Essas mudanças podem ser potencialmente usadas como marcadores espectroscópicos para a detecção de glaucoma. [57]

**Figura 18** Espectros Raman médios e espectros de diferença entre RCGs glaucomatosos e normais: (a) Basset Hounds saudáveis versus Basset Hounds glaucomatosos; (b) Beagles saudáveis versus Basset Hounds glaucomatosos. 1. Basset Hound glaucomatosos; 2. Basset Hound saudáveis; 3. Espectro de diferença (2). Beagle Saudáveis; (3). Espectro de diferença.



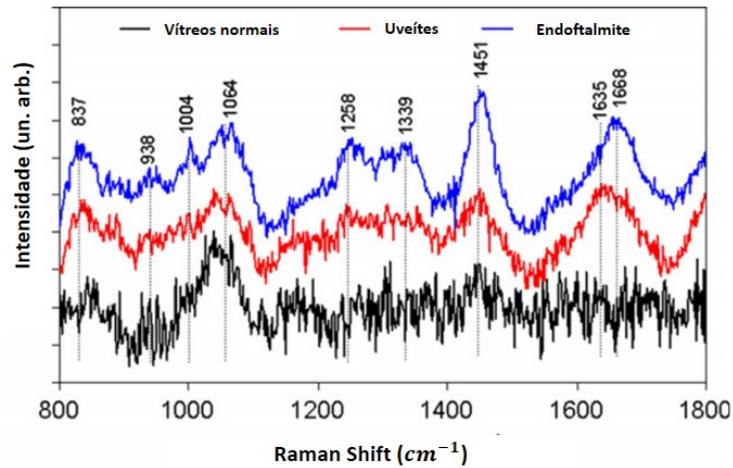
Fonte: Extraída na íntegra da referência [57]

### 3.2.3 EGLAS EMANUEL ROSSI, ANTONIO LUIZ B. PINHEIRO, OVIDIU C. BALTATU, MARCOS TADEU T. PACHECO, LANDULFO SILVEIRA JR., 2011

Neste trabalho foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman para diferenciar endoftalmite e uveíte em tecidos vítreos de olhos de coelhos *in vitro*. As amostras do tecido vítreo dissecadas e um fragmento do tecido foram sujeitas à espectroscopia Raman dispersiva utilizando excitação a laser no infravermelho próximo (830 nm, 100 mW) e espectrógrafo/câmera CCD para detecção do sinal Raman com tempo de integração de 50 s. Para classificar os espectros de endoftalmite e uveíte foram utilizados a análise de componentes principais (PCA) e distância de Mahalanobis. [55]

Logo após as medidas os espectros Raman médios de tecidos com uveíte e endoftalmite apresentaram diversas bandas na região de 800 – 1800 cm<sup>-1</sup>, conforme apresentado na figura 19. Essas regiões foram conferidas a ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas de tecido mostraram diferenças estatisticamente entre as duas doenças. [55]

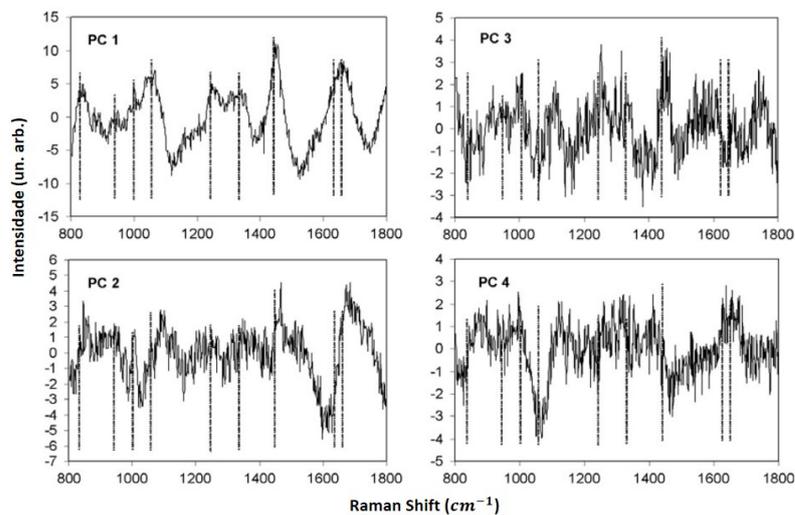
**Figura 19** Espectro Raman médio de tecidos vítreos: normal, endoftalmite induzida e uveíte induzida. Potência do laser: 80 mW; comprimento de onda 830 nm; resolução:  $10\text{ cm}^{-1}$ ; tempo de exposição: 50s. As principais características espectrais dos espectros Raman do tecidos são indicados com linhas tracejadas. O espectro normal é mostrado para comparação de recursos Raman.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [55].

Na figura 20 os autores mostraram os componentes principais PC1, PC3 e PC4 indicando as diferenças estatisticamente significativas para os dois tipos de tecidos. Os autores afirmaram que esses PCs podem ser usados para diferenciar entre os dois grupos. Este modelo de diagnóstico mostrou sensibilidade de 94 %, especificidade de 95 % e acurácia de 95 % usando  $PC3 \times PC4$ . [55]

**Figura 20** Gráfico dos vetores de componentes principais PC1-PC4 para os tecidos vítreos, com as principais características espectrais dos espectros Raman indicados com linhas tracejadas cinza.



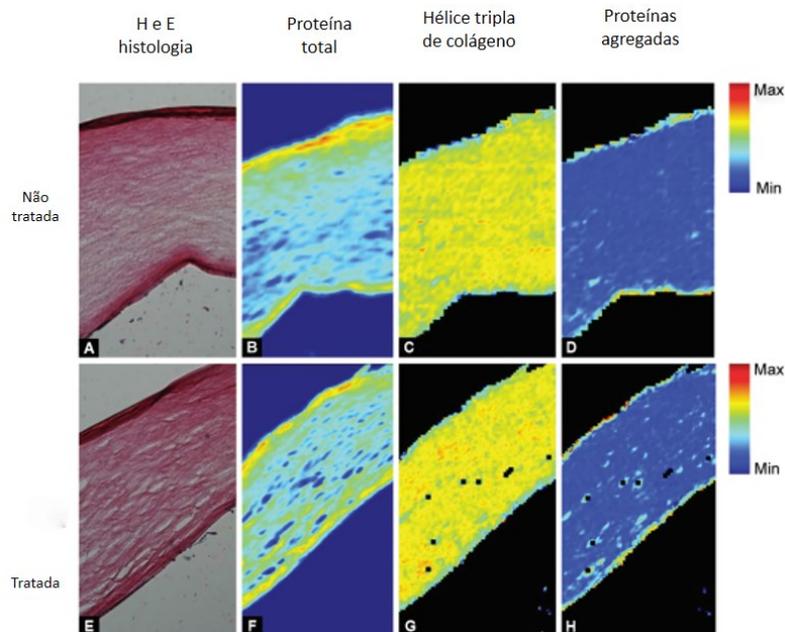
Fonte: Extraída na íntegra da referência [55].

### 3.2.4 VINAY KANSAL , JAYD LUKENCHUK , MARY-MAGDALENE U DODD, MARK HACKETT, VIKAS SHARMA, 2019

Neste trabalhos autores utilizaram a técnica de FTIR para investigar a separação temporal e espacial das ligações de colágeno da córnea que fundamentam o sucesso do procedimento que expõe a córnea à luz ultravioleta e/ou riboflavina para interromper a progressão da doença estática da córnea. O procedimento conhecido como reticulação de colágeno da córnea. [54]

Os resultados obtidos pela técnica FTIR apresentam-se na sequência da figura 21 da imagem da proteína total, área integrada sob a banda amida I de  $1.700$  a  $1.600\text{ cm}^{-1}$ , imagem FTIR de estruturas de hélice tripla de colágeno, intensidade de segunda derivada como  $1.666\text{ cm}^{-1}$  e imagem FTIR de estruturas de proteínas agregadas. Na intensidade da segunda derivada como  $1.635\text{ cm}^{-1}$  não foram detectadas diferenças nas ligações cruzadas intramoleculares entre córneas expostas a luz UV e riboflavina tratada e de controle. Os resultados apontaram que a estrutura secundária do colágeno não foi modificada significativamente e não continha evidência de agregação ou desnaturação da córnea. [54]

**Figura 21** Imagem FTIR de proteína total, estruturas de hélice tripla de colágeno e proteína agregada em seções de tecido de córnea não tratadas e seções de tecido da córnea reticuladas com luz ultravioleta e tratamento com riboflavina: (A a D) não tratado; (E a H) luz UV e riboflavina tratada; (A e E) histologia de H e E; (B e F) imagem FTIR da proteína total, área integrada sob a banda da amida I de 1.700 a 1.600  $\text{cm}^{-1}$ ; (C e G) imagem FTIR de estruturas de hélice tripla de colágeno, intensidade da segunda derivada com 1.666  $\text{cm}^{-1}$ ; (D e H) imagem FTIR de proteínas agregadas, intensidade da segunda derivada como 1.625  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: Extraída na íntegra da referência [54].

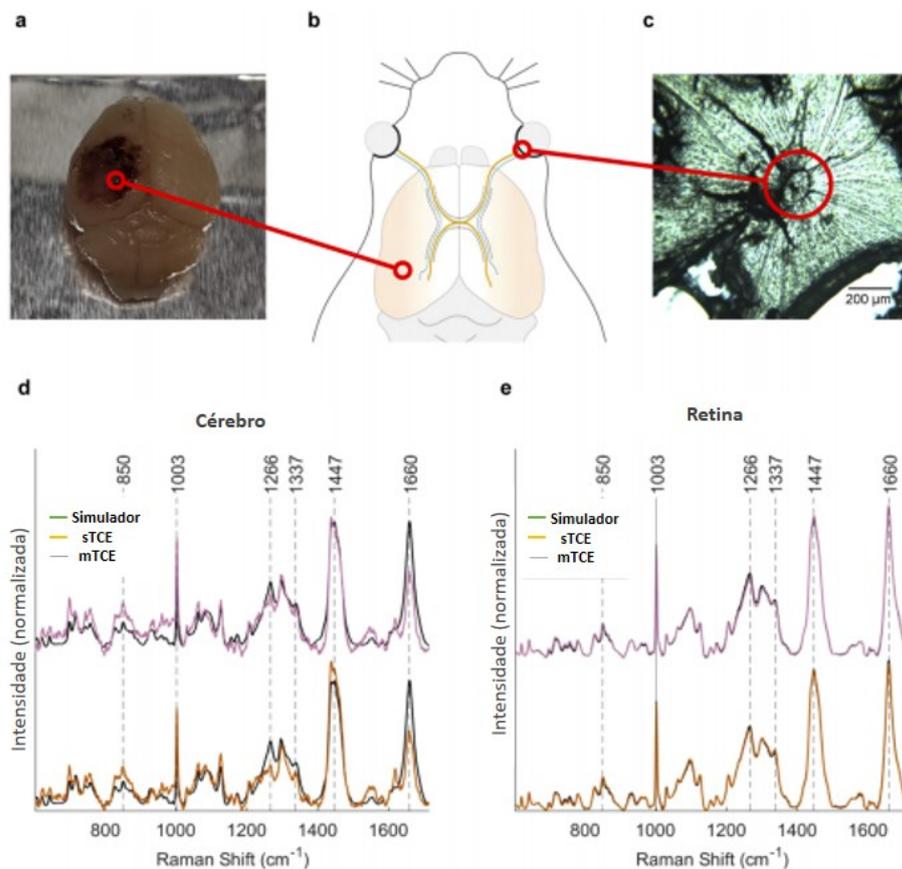
3.2.5 CARL BANBURY, IAIN STYLES, NEIL EISENSTEIN, ELISA R. ZANIER, GLORIA VEGLIANTE, ANTONIO BELLI, ANN LOGAN E POLA GOLDBERG OPPENHEIMER, 2020

Nesta pesquisa foi realizado o uso da espectroscopia Raman para medir a resposta bioquímica à retina em um modelo *ex-vivo* de traumatismo cranioencefálico (TCE). A espectroscopia Raman foi utilizada conjuntamente ao SKiNET para este estudo. Os resultados mostraram que o espectro do olho pode diferenciar TCE moderado (mTCE) e TCE severo (sTCE) de um grupo simulado e indicaram que isso é o resultado de alterações químicas semelhantes às observadas no ponto de lesão no cérebro. [58]

Os espectros Raman coletados para os três grupos, mTCE, sTCE e simulador podem ser visualizados na figura 22. Para as medidas da figura 22, os espectros Raman foram adquiridos

como medições de mapa de 400 espectros sobre cada amostra numa grade de 20x20 usando um tamanho de passo de 1,5  $\mu\text{m}$  entre os pontos, utilizando a um laser de excitação de 785 nm (50 mW). As medições do mapa de cada amostra foram calculadas para realizar um único espectro por amostra. [58]

**Figura 22** (a) Fotografia de todo o cérebro após sTCE até o córtex parietotemporal esquerdo. (b) Ilustração do cérebro e do trato óptico de camundongo, destacando as projeções ipsilaterais (azul) e contralaterais (laranja) que conectam o cérebro à retina. (c) Exemplo de uma imagem de microscopia de campo claro de uma retina montada plana do grupo mTCE. (d) Espectros Raman médios coletados no núcleo de contusão para mTCE e sTCE em comparação com o grupo simulador. (e) Espectros Raman médio coletados de amostras de retina montadas planas (ambos os olhos), mostrando mTCE e sTCE em comparação com o grupo simulador.

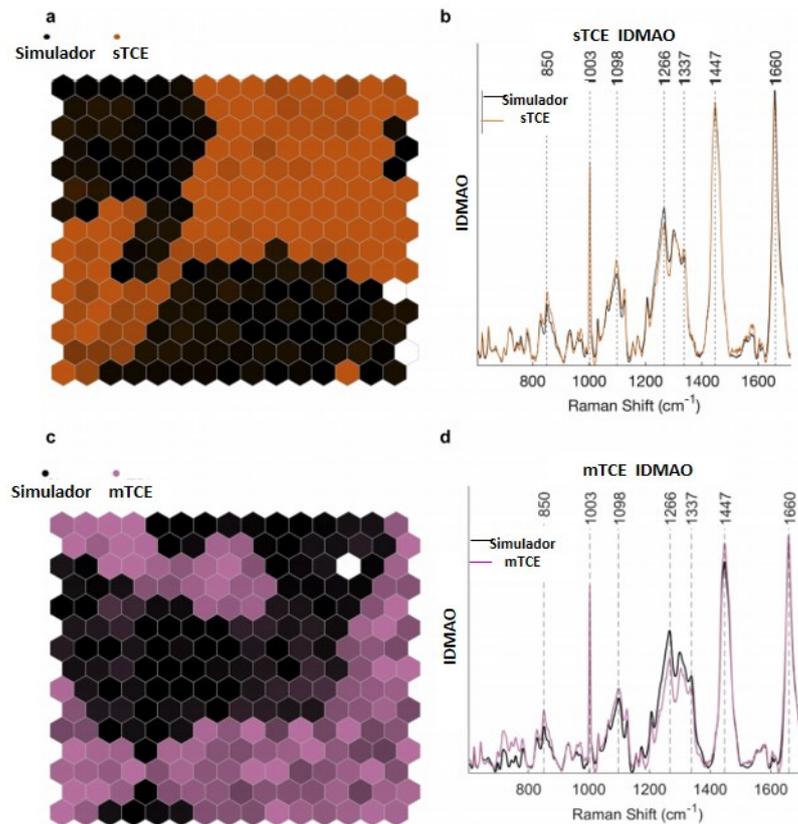


Fonte: Extraída na íntegra da referência [58].

Na figura 22d observa-se mudanças significativas nas bandas ao redor 1.266 e 1.660  $\text{cm}^{-1}$ , na figura 22e, os dados da retina são quase indiscrimináveis em todo os três estados de lesão. [58]

Na figura 23 visualiza-se o espectro Raman da retina utilizando uma técnica de aprendizado de máquina baseada em mapas auto-organizáveis (MAO). Permite analisar quais características espectrais são responsáveis os agrupamentos encontrados em MAO e corresponde a uma forma de extração de características usando o índice discriminante de mapa auto organizável (IDMAO). [58]

**Figura 22** Agrupamento de espectros Raman da retina para os grupos sTCE (laranja) e simulador (preto) usando um MAO. (b) Características extraídas (IDMAO) do MAO mostrado em (a), destacando as bandas Raman mais influentes para os neurônios no MAO para grupos simuladores e sTCE. (c) Agrupamento de espectros Raman mTCE (roxo) e simulador (preto) da retina usando um MAO. (d) Recursos extraídos de MAO em c, destacando as bandas Raman para grupos simuladores e mTCE.



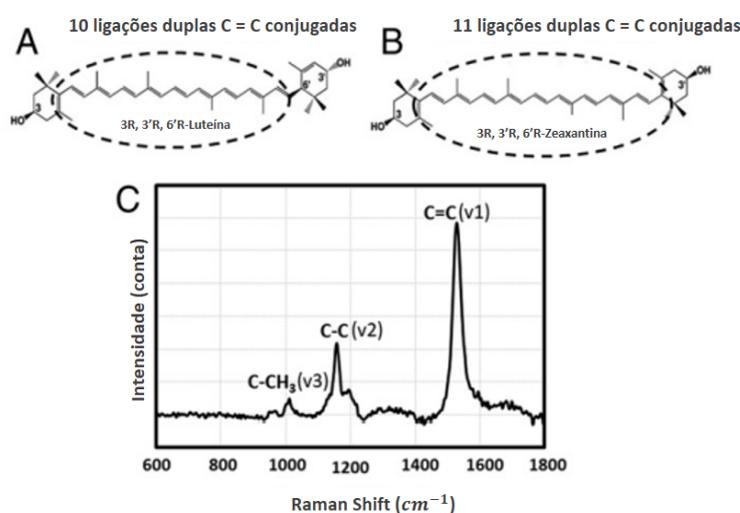
Fonte: Extraída na íntegra da referência [58].

Através do espectro da retina foi possível classificar a gravidade da lesão para TCE grave (82 %), TCE moderado (75,1 %) e grupos simuladores (69,4 %). Os autores argumentam que os resultados do trabalho indicaram que a espectroscopia óptica pode ser usada para explorar o olho como a janela para o cérebro. [58]

3.2.6 BINXING LI, EVAN W. GEORGE, GREGORY T. ROGNON, ARUNA GORUSUPUDI, ARUNKUMAR RANGANATHAN, FU-YEN CHANG, LINJIA SHI, JEANNE M. FREDERICK E PAUL S. BERNSTEIN, 2020.

Neste trabalho os autores utilizaram a técnica espectroscópica Raman de ressonância focal para mapear as distribuições diferenciais de luteína e zeaxantina em retinas de doadores humanos. A luteína e a zeaxantina são carotenoides xantofila em abundância na mácula humana com a função de proteger o olho do dano oxidativo e auxiliar no momento do funcionamento visual. Na figura 24 podem ser visualizados os grupos funcionais e um espectro Raman típico de carotenoides maculares nos quais identificam-se os três principais picos em cerca de 1.500 (v1), 1.150 (v2) e 1.000  $\text{cm}^{-1}$  (v3). [59]

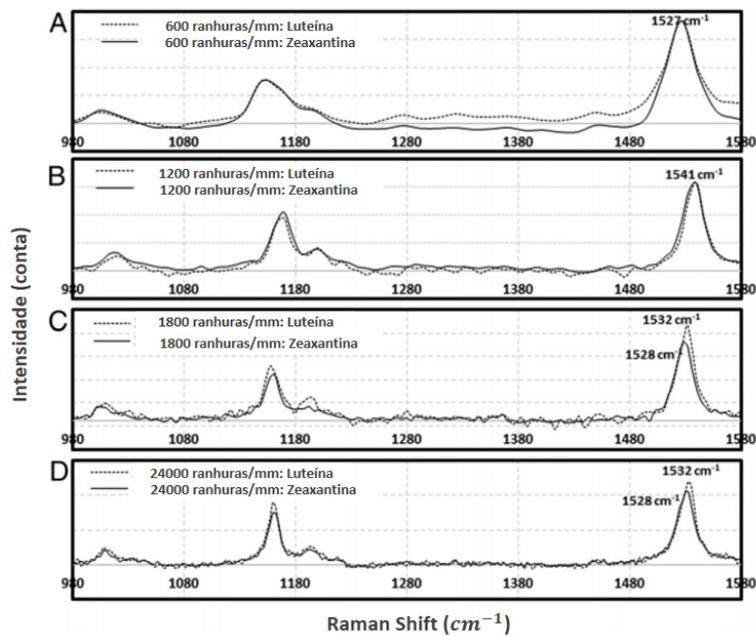
**Figura 23** Estruturas químicas e um espectro Raman comum de carotenoides maculares. (A) Luteína. (B) Zeaxantina. (C) Um espectro Raman de zeaxantina demonstrando o espectro Raman típico de um carotenoide. Três picos principais posicionam-se em cerca de 1.500 (v1), 1.550 (v2) e 1.000  $\text{cm}^{-1}$  (v3). Eles se originam de vibrações de ligações duplas C = C conjugadas, ligações simples C – C e grupos metil nas moléculas carotenoides, respectivamente. Em teoria, um carotenoide com conjugação de dupla ligação C = C mais longa posiciona seu pico em uma frequência Raman menor, tornando possível distinguir a luteína da zeaxantina.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [59].

Nesta pesquisa primeiramente foram aperfeiçoadas as condições para diferenciar a luteína das zeaxantinas usando um microscópio Raman de ressonância confocal de alta resolução (figura 25). [59]

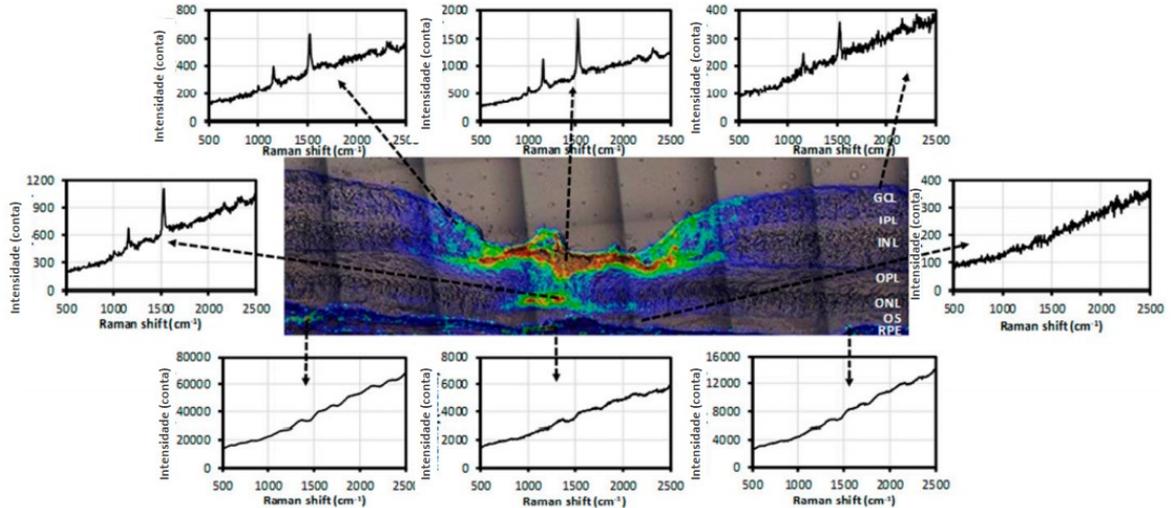
**Figura 24** Otimização das condições de aquisição para microscopia Raman de ressonância confocal para distinguir a zeaxantina da luteína. Os padrões de zeaxantina e luteína foram dissolvidos em metanol em concentrações de 10  $\mu\text{M}$ . De quatro grades Raman, (A) 600, (B) 1.200, (C) 1.800, e (D) 2.400 ranhuras/mm, as 1.800 e 2.400 ranhuras/grades mm foram os melhores. As mudanças Raman dos picos das vibrações da ligação C = C de zeaxantina e luteína foram distinguíveis em 1.528 e 1.532  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [59].

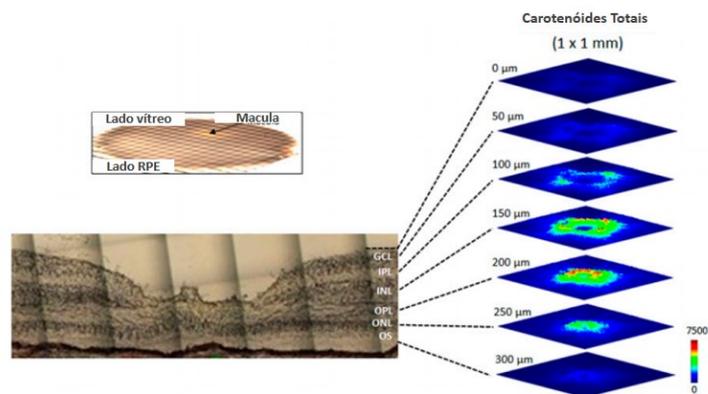
Posteriormente foram medidas separadamente as distribuições de luteína e zeaxantinas em seções retiniais humanas. Na figura 26 pode ser observado o espectro Raman nas regiões de interesse no mapa de intensidade de carotenoides e em imagens Z-stack de uma retina humana montada em plano que pode ser observada na figura 25.

**Figura 25** Espectro Raman em locais selecionados no mapa de intensidade de carotenoides totais.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [59].

**Figura 26** Imagens Z-stack de carotenoides totais em uma retina humana plana. A seta mostra a mácula lútea de um punção macular de 8 mm de um doador saudável de 86 anos de idade. Os carotenoides totais em um quadrado de 1 x 1 mm centrado na fóvea foram fotografados da superfície vítrea até a camada de segmento externa a cada 50  $\mu\text{m}$ , rendendo sete imagens a uma profundidade de 300  $\mu\text{m}$ . A imagem microscópica de luz no canto inferior esquerdo é de um olho doador diferente e é fornecida apenas pra fins de orientação.



Fonte: Extraída na íntegra da referência [59]

A partir dos resultados deste trabalho, concluiu-se que a zeaxantina está localizada no centro foveal em altas concentrações da membrana limitadora interna à membrana limitadora externa, e a luteína é distribuída no interior da retina em uma concentração baixa. Segundo os

autores, os resultados suportam a hipótese de que a zeaxantina é mais importante do que a luteína como pigmento macular foveal e que o cone de células Müller é um reservatório de pigmento macular. Os autores afirmam que mais estudos Raman de ressonância confocal do pigmento macular fornecerão informações complementares sobre o papel dos carotenoides (pigmento macular) na retina saudável ou não. [59]

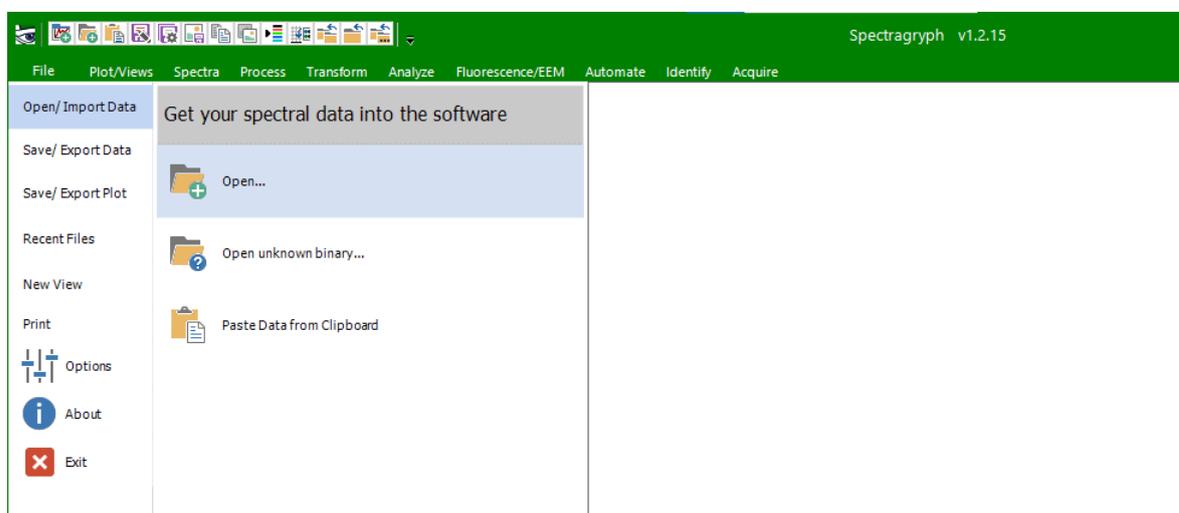
## 4 SOFTWARE

Existem vários softwares para analisar as técnicas espectroscópicas citadas neste trabalho. Nesta seção será apresentado um passo-a-passo de como um espectro é analisado utilizando o programa “*Spectragryph v1.2.15*”. Este programa é gratuito para o uso privado e acadêmico.

O *Spectragryph* é um programa no qual pode-se plotar, processar, analisar e converter dados espectrais. Os dados espectrais podem ser combinados em único gráfico de, por exemplo, FTIR e Raman.

Na figura 28 apresenta-se a tela para abrir os dados espectrais. Primeiramente coloque o cursor do mouse na aba “File”, clique com o botão esquerdo no mouse em “Open/Import data”, logo após selecione a opção “Open”.

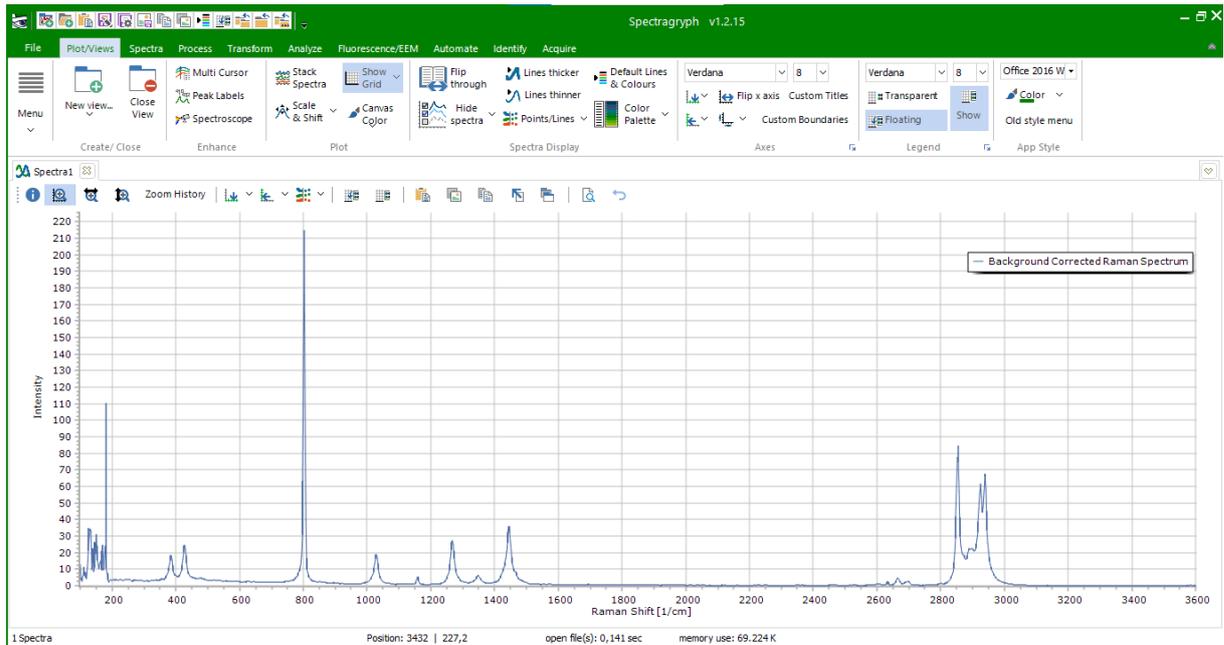
**Figura 27** Interface do programa *Spectragryph*, como abrir dados espectrais.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Ao selecionar os dados espectrais que você deseja visualizar na tela inicial irá aparecer o espectro gerado a partir dos dados espectrais selecionados, como pode ser visualizado na figura 29. Neste caso é um espectro Raman.

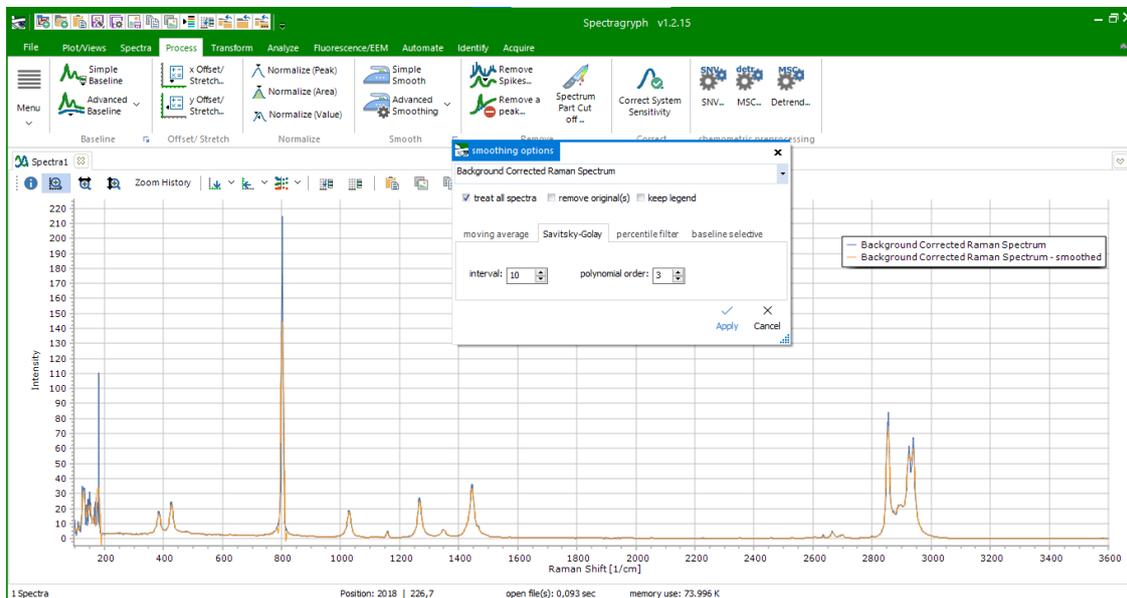
**Figura 28** Espectro Raman



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Para iniciar o pré-processamento do espectro Raman, basta selecionar a aba “Process”. Para corrigir os ruídos será utilizado o algoritmo de suavização Savitzky-Golay que está localizado na opção “Advanced Smoothing”. Após clicar com o botão direito, selecione a opção Savitz-Golay, confirme em “Apply”, como indicado na figura 30.

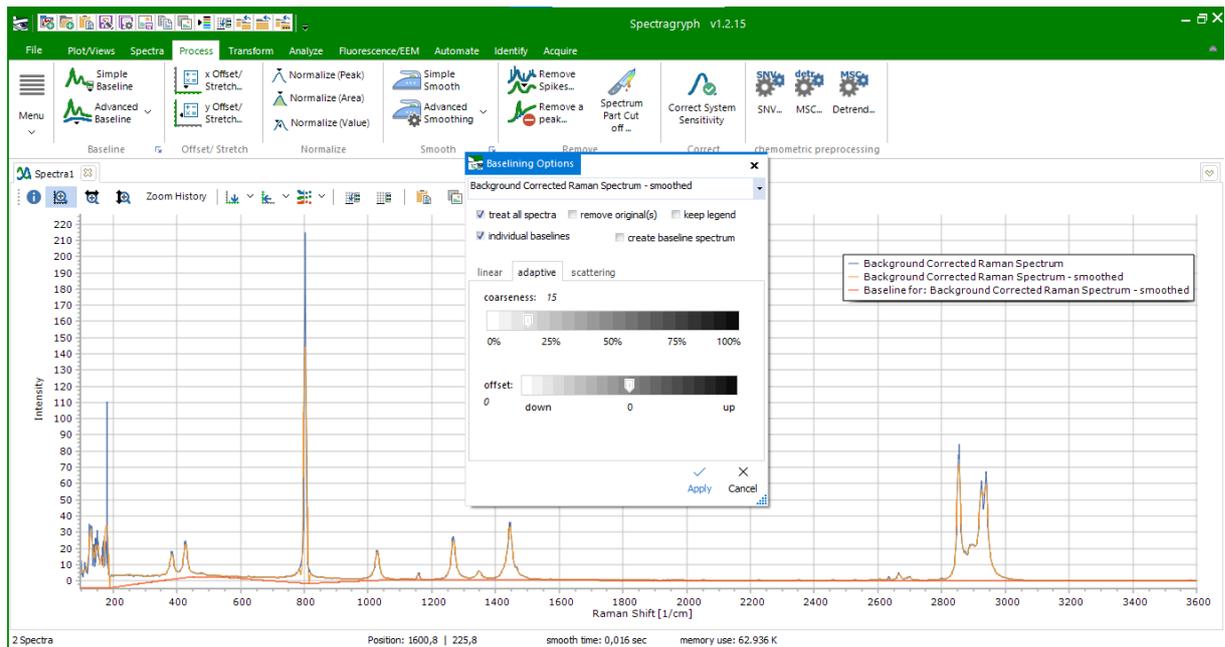
**Figura 29** Algoritmo de suavização de Savitzky-Golay



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Pode ser observado uma curva em amarelo proveniente da suavização. A segunda correção será da linha de base. Neste caso o deslocamento pode ocorrer devido ao espalhamento ou a fluorescência gerada por alguma molécula biológica que aparecem nos espectros medidos. Ainda na aba “Process”, clique em “Advanced Baseline”, uma janela irá aparecer, clique em “Apply”, como mostrado na figura 31.

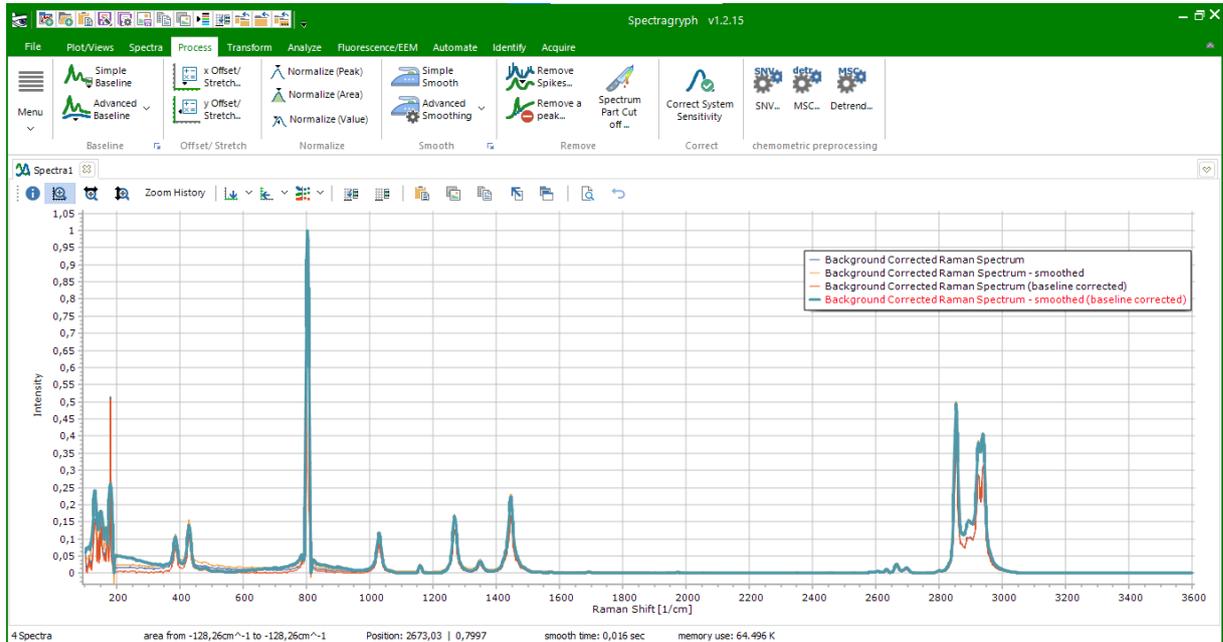
**Figura 30** Correção da linha de base.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

O próximo passo é normalização, no qual os valores da intensidade são redimensionados. Para este passo, clique em “Normalize (peak)”. Na figura 32 essa etapa pode ser visualizada e o espectro em destaque em azul com a linha de base está corrigido, suavizado e normalizado.

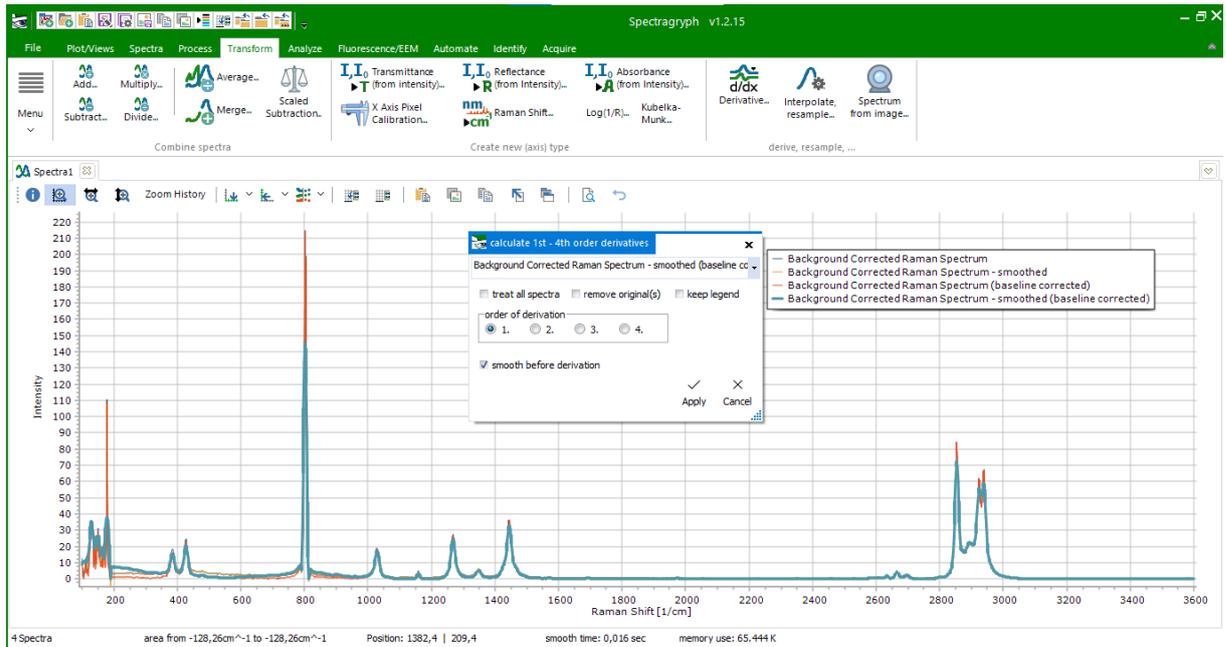
**Figura 31** Espectro Raman normalizado.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

A técnica da derivada é utilizada para correção de fundo para reduzir as interferências no fundo espectral na análise quantitativa. Para obter a primeira derivada, clique na aba “Transform”, em seguida, na janela que abrir, selecionar a ordem da derivada, neste caso será selecionado “1”, e também selecione o espectro Raman com a linha de base corrigida, suavizada e normalizada, conforme apresentado na figura 33.

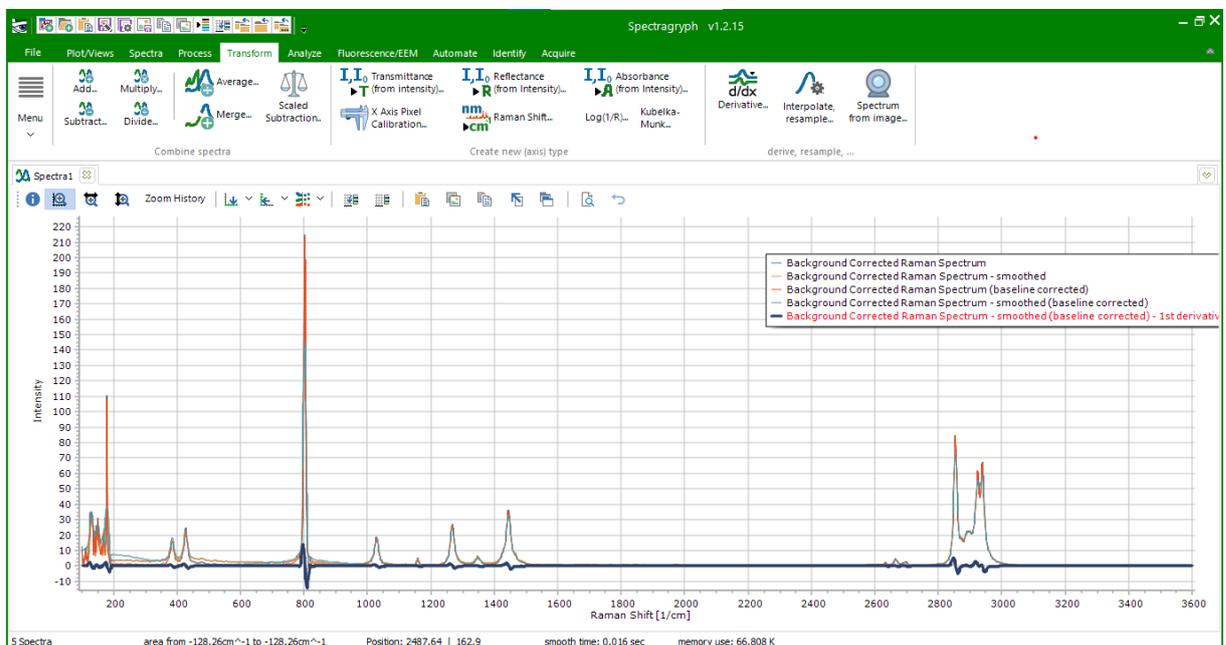
**Figura 32** Técnica da derivada para o espectro Raman.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Na figura 34 pode ser observada a curva em destaque da primeira derivada do espectro Raman selecionado. Os espectros da primeira derivada evitam as contribuições de flutuações no fundo espectral, porém são sensíveis às flutuações de intensidade Raman.

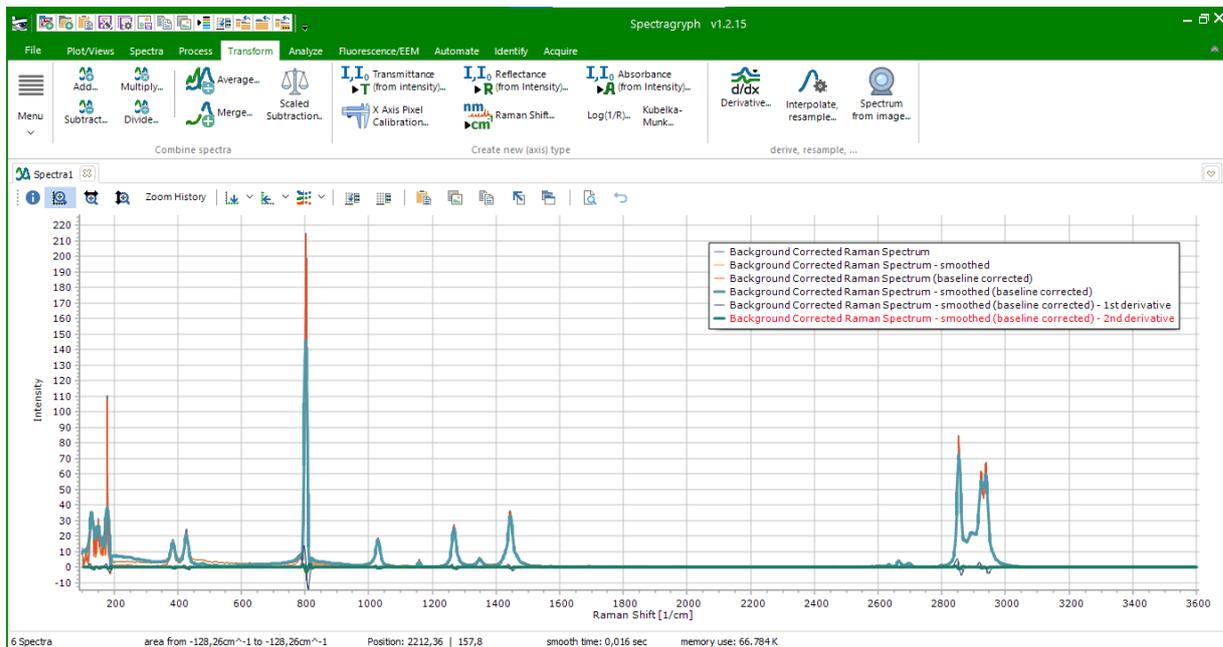
**Figura 33** Primeira derivada da curva do espectro Raman.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Para obter o espectro da segunda derivada, é o mesmo processo do passo anterior e selecionar a ordem de derivada “2”. Na figura 31 pode ser observado a curva verde em destaque da segunda derivada do espectro Raman.

**Figura 34** Segunda derivada da curva do espectro Raman



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

A elaboração deste mini roteiro teve por finalidade auxiliar aqueles que pretendem iniciar os trabalhos de análise de resultados obtidos com técnicas espectroscópicas.

## 5 CONCLUSÃO

Podemos concluir através da análise dos artigos que nos últimos anos uma evolução no uso das técnicas espectroscópicas, Raman e no infravermelho, na área da Oftalmologia. Como por exemplo em 1989 pesquisadores investigaram o diagnóstico de catarata utilizando lentes de animais e humanas[34], posteriormente em 2020, os pesquisadores fizeram um aferimento da resposta bioquímica à retina em um modelo *ex-vivo* de traumatismo cranioencefálico[52].

As técnicas espectroscópicas não destrutivas e não invasivas citados neste trabalho foram utilizadas para diferentes tecidos oculares permitindo avanços no diagnóstico de doenças. Essas técnicas proporcionam o estudo á nível molecular, e observamos que é possível o monitoramento das estruturas dos tecidos oculares.

A tendência é que o desenvolvimento do uso dessas técnicas espectroscópicas seja constante, pois a cada trabalho publicado, abre-se uma janela na área de pesquisa para ser mais explorada, e sempre um caminho mais prático para as investigações é fornecido com a evolução da tecnologia.

## REFERÊNCIAS

- [1] WHO. **World report on vision**. 2019. Disponível em: <<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>>
- [2] OP-TEC. **Basic of Spectroscopy**. University of Central Florida, 2008.
- [3] PALUSZKIEWICZ, C. et al. Differentiation of protein secondary structure in clear and opaque human lenses: AFM – IR studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 139, 125–132, 2017.
- [4] OZAKI, Y. et al. Raman spectroscopic study of age-related structural changes in the lens proteins of an intact mouse lens. **Biochemistry**, 22(26), 6254–6259, 1983.
- [5] RIORDAN-EVA, P.; AUGSBURGER, J. VAUGHAN & ASBURY'S. **General Ophthalmology**. 19th ed. United States: McGraw-Hill Education, 2017.
- [6] PURVES, D. **Neuroscience**. 2. ed. Rio Grande do Sul: ARTMED, 2005.
- [7] SUN, X. et al. Construction and Evaluation of Collagen-Based Corneal Grafts Using Polycaprolactone to Improve Tension Stress. **ACS Omega**, 2020.
- [8] MAIA, N. C. F. **Fundamentos básicos da oftalmologia e suas aplicações**. Tocantins: EDUFT, 2018.
- [9] HASHEMI, H. et al. Keratoconus indices and their determinants in healthy eyes of a rural population. **Journal of Current Ophthalmology**, 2019.
- [10] SCHIRMBECK, T; et al. Efficacy and low cost in keratoconus treatment with rigid gas-permeable contact lens. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.68, n. 2, p. 219-222, 2005.
- [11] WRIGHT, H. R.; TURNER, A.; TAYLOR, H. R. Trachoma. **The Lancet**, 2008.
- [12] MOTTA, C.; et al. Lente Macular Scharioth. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 5, p. 342 – 344, 2019.

- [13] KNIGGENDORF, V.; DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V. Age-related macular degeneration: a review of current therapies and new treatments. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2020.
- [14] BEN, Â. J.; et al. Cost-utility Analysis of Opportunistic and Systematic Diabetic Retinopathy Screening Strategies from the Perspective of the Brazilian Public Healthcare System. **Applied Health Economics and Health Policy**, 2019.
- [15] FUJIHARA FMF, et al. Individual Macular Layer Evaluation with Spectral Domain Optical Coherence Tomography in Normal and Glaucomatous Eyes. **Clin Ophthalmol**, 2020.
- [16] VRENSSEN, G. F. J. M.; et al. Protein profiles in cortical and nuclear regions of aged human, donor lenses: A confocal Raman microspectroscopic and imaging study. **Experimental Eye Research**, 145100–109, 2016.
- [17] ALMANCA, A. C. D.; JARDIM, S. P.; DUARTE, S. R. M. P. Epidemiological profile of the patient undergoing cataract surgery. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 77, n. 5, p. 255-260, 2018.
- [18] SANTOS, N.; VEIGA, P.; ANDRADE, R. Importance of history and physical examination for of the care nurses. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Salvador-BA, 2010.
- [19] SEBAG, J.; SADUN, A. A.; PIERCE, E. A. Paradigm shifts in ophthalmic diagnostics. Trans. **Am. Ophthalmol**, Soc. 114:WP1, 2016.
- [20] REZENDE, J. M. Linguagem Médica. Exame.Método.Técnica.Procedimento.Prova,Teste.Reação. **Rev. Pat.**, p.335-338, 1996.
- [21] RODRIGUES, M. L. V. Semiologia Oftalmológica. **Medicina**, Ribeirão Preto, 1996.
- [22] RODRIGUES CRC. Relação médico-paciente. Oftalmologia clínica. **Cultura Médica**, Rio de Janeiro, p. 1-10, 1992.
- [23] YAMANE R. Exame físico do bulbo ocular e seus anexos. Oftalmologia clínica. **Cultura Médica**, Rio de Janeiro, p. 50-60, 1992.

- [24] RODRIGUES MLV, S. P.; RODOLPHO JÚNIOR, T. Avanços da tecnologia no diagnóstico e tratamento dos problemas oculares. In: Setor de Oftalmologia do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da FMRP-USP. **Oftalmologia para Alunos de Graduação em Medicina. Legis Summa**, Ribeirão Preto, p. 133-138, 1992.
- [25] ILLALVAÍN-RODES, I.; PASTORA SALVADOR, N.; PERALTA CALVO, J. Clinical characteristics and OCT analysis of a case series of posterior microphthalmos. **Arch Soc Esp Ophthalmol**. Epub, May, 2020.
- [26] ARANA, L. A.; et al. Tomografia de coerência óptica na avaliação da camada de fibras nervosas peripapilar nos usuários de cloroquina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2010.
- [27] MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, p. 493–541, 2007.
- [28] GANTRI, M.; et al. Computational Laser Spectroscopy in a Biological Tissue. **Journal of Biophysics**, 2010.
- [29] MITSUTAKE, H., et al. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 30, n. 11, p. 2243-2258, 2019.
- [30] RAMOS DE CARVALHO, J.E.; et al. Recent advances in ophthalmic molecular imaging. **Surv Ophthalmol**, 2014.
- [31] BADIZADEGAN, K.; et al. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. **Faraday Discussions**, 2004
- [32] LIN, S.Y.; et al. Spectral analysis and comparison of mineral deposits forming in opacified intraocular lens and senile cataractous lens. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 2010.
- [33] WEISSBRODT, D.; et al. Non-invasive measurement of intraocular pressure by near-infrared spectroscopy. **Am J Ophthalmol**, 2005.

- [34] SACHARZ, J.; et al. A 2D correlation Raman spectroscopy analysis of a human cataractous lens. **Journal of Molecular Structure**, 2016.
- [35] BERTOLUZZA, A.; et al. In vivo Raman spectroscopy of human, animal and artificial ocular lenses. **Journal of Molecular Structure**, 1989.
- [36] BERTOLUZZA, A.; et al. Structural properties and biocompatibility of polymers used in ophthalmology. **Clinical Materials**, 1991.
- [37] UFU. Projeto Pedagógico do curso de graduação em Física Médica. **Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Física**. Uberlândia – MG, 2016.
- [38] NPTEL . Biotechnology Bioanalytical Techniques and Bioinformatics. **Spectroscopic techniques**. MHRD. [20--]
- [39] TIPLER, P. A.; LLEWELLYN, R.A. **Física Moderna**. 6. ed., LTC, Rio de Janeiro, 2014.
- [40] KUMAR, P. Fundamentals and Techniques of Biophysics and Molecular biology. **New Delhi: Pathfinder publication**, p. 33, 2018.
- [41] UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Diretrizes sobre os dispositivos Raman portáteis para identificação de material apreendido no terreno**. [20--]
- [42] PANSARE, K., KRISHNA, C. M. Raman Theranostics: An overview of Raman applications in therapeutic monitoring. **Asian Journal of Physics**, v. 29, n. 3&4, p. 261-272, 2020.
- [43] BRUSATORI, M.; et al. Intraoperative Raman Spectroscopy. **Neurosurg Clin N Am**, 2017.
- [44] AGILENT TECHNOLOGIES. **Princípios da espectroscopia molecular: Hardware**. 2016.
- [45] GUANABARA, K., et al. **Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica**. 2009.

- [46] UFJF. **Fundamentos da espectrofotometria**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora-MG, 2016.
- [47] DAVID I. ELLIS et al. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. **Analyst**, p 3871, 2013.
- [48] SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J. E.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. São Paulo: Bookman, 2009.
- [49] SCHRADER, B. E.; BOUGEARD, D. Infrared and Raman Spectroscopy. **Methods and Applications**. Weinheim: VCH, 1995.
- [50] FLETCHER, P. D. I.; HASWELL, S. J. E; ZHANG, X. Monitoring of chemical reactions within microreactors using an inverted Raman microscopic spectrometer. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3239-3245, 2003.
- [51] VRENSEN, G. F. J. M.; et al. Protein profiles in cortical and nuclear regions of aged human donor lenses: A confocal Raman microspectroscopic and imaging study. **Experimental Eye Research**, v. 145, p. 100–109, 2016.
- [52] MIZUNO, A.; TOSHIMA, S.; MORI, Y. Confirmation of Lens Hydration by Raman Spectroscopy. **Experimental Eye Research**, v. 50, p. 647-649, 1990.
- [53] PELLETIER, C. C.; LAMBERT, J. L.; BORCHERT, M. Determination of Glucose in Human Aqueous Humor Using Raman Spectroscopy and Designed-Solution Calibration. **Applied Spectroscopy**, v. 59, p. 1024–1031, 2005.
- [54] KANSAL, V.; et al. Analysis of the Change Induced by Riboflavin an Ultraviolet Light on Corneal Collagen by Infrared Spectrometry. **International Journal of Keratoconus and Ectatic Corneal Diseases**, p. 10025-1174. 2019.
- [55] ROSSI, E. E.; et al. Differential diagnosis between experimental endophthalmitis and uveitis in vitreous with Raman spectroscopy and principal components analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 107, p. 73–78, 2012.

[56] LIN, S.-Y.; et al. Non-destructive analysis of the conformational changes in human lens lipid and protein structures of the immature cataracts associated with glaucoma. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 54(10), p. 1509–1517, 1998.

[57] WANG, Q.; Exploring Raman spectroscopy for the evaluation of glaucomatous retinal changes. **Journal of Biomedical Optics**, 2011.

[58] BANBURY, C.; Spectroscopic detection of traumatic brain injury severity and biochemistry from the retina. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 11, p. 6249-6261. 2020.

[59] LI, B.; et al. Imaging lutein and zeaxanthin in the human retina with confocal resonance Raman microscopy. **Columbia University Medical Center**, 2020.

