

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALINE PAOLA CARNEIRO CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES PLASMÔNICAS PARA
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

Porto Alegre
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALINE PAOLA CARNEIRO CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES PLASMÔNICAS PARA DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico – QUI” do Curso de Bacharelado em Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau Bacharela em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Klester dos Santos Souza
Coorientador: Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes

Porto Alegre
2024

CIP - Catalogação na Publicação

Cardoso, Aline Paola Carneiro
Desenvolvimento de superfícies plasmônicas para
diagnóstico diferencial de câncer de endométrio /
Aline Paola Carneiro Cardoso. -- 2024.
57 f.
Orientador: Klester dos Santos Souza.

Coorientador: Adriano de Araújo Gomes.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. Nanopartículas. 2. Substrato plasmônico. 3.
SERS. 4. Câncer de endométrio. 5. Métodos
quimiométricos. I. Souza, Klester dos Santos, orient.
II. Gomes, Adriano de Araújo, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Paola Carneiro Cardoso

Desenvolvimento de Superfícies Plasmônicas para Diagnóstico Diferencial de
Câncer de Endométrio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico – QUI” do curso de Bacharelado em Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau Bacharela em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Klester dos Santos Souza

Coorientador: Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes

Aprovada em: Porto Alegre, 09 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza
Orientador

Profa. Dra. Legna Andreina Colina Vegas
Universidade Federal do Rio Gande do Sul

Profa. Dra. Jessie Sobieski da Costa
Instituição do membro da banca

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio
e Bertolina.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse trabalho representa a consolidação de um sonho, o qual não sonhei sozinha. A todas as pessoas que fizeram parte da minha jornada até aqui e que me permitiram construir tudo que aprendi, não existem palavras para agradecer.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Bertolina, que sempre me incentivaram a buscar aquilo que ninguém pode tirar de mim – o conhecimento. Aqui eu deixo expresso o meu amor sem limite por vocês e pelos meus irmãos, Marques e Talita;

Ao meu companheiro de vida, William, que esteve segurando a minha mão em todos os momentos desta caminhada. A minha força também vem de ti, meu amor;

Ao meu orientador, Professor Klester dos Santos Souza que me orientou com maestria. Obrigado por toda ajuda e boa vontade em partilhar seus conhecimentos. Sou muito grata pela oportunidade de ter trabalhado ao seu lado. Tu és um exemplo a ser seguido;

Ao meu co-orientador, Professor Adriano de Araújo Gomes que nos forneceu todo suporte na análise quimiométrica. Muito obrigado!

Ao Arturo Bismarck Linares Veliz que me ajudou na síntese das nanopartículas de prata;

À Cristiane dos Santos que me auxiliou nas medidas de espectroscopia UV-Visível da solução colóide de nanopartículas de prata;

Ao Professor Marcelo Barbalho Pereira que contribuiu com a análise de espectroscopia UV-Visível dos substratos plasmônicos;

Ao Professor João Henrique Zimnoch dos Santos que intermediou a análise de microscopia eletrônica de varredura;

Ao Professor Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho e a doutoranda Ana Rita Peixoto Panazzolo, ambos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras de sangue.

Aos Institutos de Química e Física da UFRGS;

Ao CNPq e a Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq UFRGS) pelo apoio à pesquisa científica.

RESUMO

A Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) possibilita um aumento significativo do espalhamento Raman por meio da interação do campo eletromagnético com os plasmons de superfície. Atualmente, existe um grande interesse biomolecular pelas superfícies SERS, visto que essas se mostram eficientes na identificação de substâncias. Este trabalho descreve a preparação de solução coloidal de prata, bem como a sua caracterização espectral para posterior utilização na fabricação de superfície SERS. A síntese da solução coloidal seguiu o método de redução química, utilizando AgNO_3 e excesso de NaBH_4 . As nanopartículas sintetizadas apresentaram um máximo de absorção em 392 nm com pico em formato gaussiano, as imagens MEV confirmaram a formação de partículas esféricas com tamanhos de 30 ± 5 nm. As nanopartículas de prata (AgNPs) foram utilizadas na formação de filmes finos de prata sobre slides de vidro com o objetivo de produzir substratos plasmônicos. Esses materiais apresentaram formação de filmes de AgNPs, verificados visualmente e principalmente a partir de medidas de absorção dos substratos onde observou-se picos característicos de filme de AgNP com comprimento de onda máximo em torno de 503 nm. A possibilidade de aplicação destes substratos produzidos como substratos SERS (Espectroscopia Raman intensificada por superfície) ativo, foi avaliada utilizando diferentes concentrações de solução de azul de metileno. Foi observado a banda característica do AM até para concentrações de 10^{-8} mol/L, confirmando sua eficiência enquanto substrato SERS ativo. Os substratos foram testados como superfícies SERS para análise de amostras de sangue no diagnóstico diferencial de câncer de endométrio. Analisou-se 11 amostras de pacientes pertencentes ao grupo de controle e 12 amostras de pacientes diagnosticadas com câncer de endométrio. A identificação e diferenciação das amostras foi realizada por meio das bandas consideradas características de cada composto. Os espectros apresentaram bastante informação vibracional e, embora, algumas regiões espectrais fossem visualmente semelhantes, o uso da análise quimiométrica foi indispensável para uma melhor diferenciação entre as amostras. Dessa forma, aliamos os resultados SERS com métodos quimiométricos objetivando classificar entre as amostras do grupo controle e do grupo com câncer de endométrio. Para a classificação dos dados foi utilizado o algoritmo das projeções sucessivas (SPA) combinado com análise canônica de Fisher (CVA) fornecendo uma boa discriminação entre os grupos, com 84 % das amostras sendo distinguidas corretamente. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram a eficiência de substratos nanoestruturados na intensificação dos sinais Raman.

Palavras-chave: Nanopartículas. Substrato Plasmônico. SERS. Câncer de endométrio. Métodos quimiométricos.

ABSTRACT

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) enables a significant increase in Raman scattering through the interaction of the electromagnetic field with surface plasmons. Currently, there is great biomolecular interest in SERS surfaces, as they have proven efficient in the identification of substances. This work describes the preparation of a silver colloidal solution, as well as its spectral characterization for subsequent use in the fabrication of SERS surfaces. The synthesis of the colloidal solution followed the chemical reduction method, using AgNO_3 and excess NaBH_4 . The synthesized nanoparticles exhibited a maximum absorption at 392 nm with a Gaussian-shaped peak, and MEV images confirmed the formation of spherical particles with sizes of 30 ± 5 nm. The silver nanoparticles (AgNPs) were used to form thin silver films on glass slides to produce plasmonic substrates. These materials showed the formation of AgNP films, visually verified and mainly confirmed by absorption measurements of the substrates, where characteristic peaks of the AgNP film were observed with a maximum wavelength around 503 nm. The potential application of these substrates as active SERS substrates was evaluated using different concentrations of methylene blue solution. The characteristic AM band was observed even at concentrations of 10^{-8} mol/L, confirming its efficiency as an active SERS substrate. The substrates were tested as SERS surfaces for the analysis of blood samples in the differential diagnosis of endometrial cancer. Eleven samples from patients in the control group and twelve samples from patients diagnosed with endometrial cancer were analyzed. The identification and differentiation of the samples were carried out through the bands considered characteristic of each compound. The spectra provided substantial vibrational information, and although some spectral regions were visually similar, the use of chemometric analysis was essential for better differentiation between the samples. Thus, we combined SERS results with chemometric methods to classify between the control group samples and the endometrial cancer group samples. The data classification was performed using the Successive Projections Algorithm (SPA) combined with Canonical Variate Analysis (CVA), providing good discrimination between the groups, with 84% of the samples correctly distinguished. The results obtained in this study demonstrate the efficiency of nanostructured substrates in enhancing Raman signals.

Keywords: Nanoparticle. Plasmonic substrate. SERS. Endometrial cancer. Chemometric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo dos tipos de espalhamento Raman	21
Figura 2: Diagrama esquemático do mecanismo de transferência de carga entre uma molécula adsorvida em um eletrodo metálico num sistema eletroquímico-SERS	24
Figura 3: Representação da excitação da ressonância localizada de plasmon de superfície (LSPR)	26
Figura 4: Imagem das lâminas de vidro imersas na solução coloidal AgNPs	34
Figura 5: Imagem das lâminas de vidro submergidas em solução de APTMS e HCl 0,10 mol/L	34
Figura 6: Imagem dos substratos após os cinco ciclos de deposição das AgNPs ...	35
Figura 7: Deposição das diferentes concentrações de solução corante AM sobre a superfície do substrato plasmônico	36
Figura 8: Imagem da solução coloidal de nanopartículas de prata sintetizada (A) e Espectro da absorção UV-VIS da solução coloidal de AgNPs (B)	37
Figura 9: Imagens de microscopia de varredura das AgNPs sintetizadas	38
Figura 10: Histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs	38
Figura 11: Espectro de absorção UV-VIS do substrato plasmônico formado pela deposição das monocamadas de AgNPs	39
Figura 12: Espectros Raman obtidos dos substratos sintetizados utilizando diferentes concentrações de solução de corante AM	40
Figura 13: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 1 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b)	41
Figura 14: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 2 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b)	42
Figura 15: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 3 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b)	42
Figura 16: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo de controle	43
Figura 17: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo de pacientes com câncer de endométrio	44

Figura 18: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo controle e neoplasia	44
Figura 19: Espectros derivados para as amostra de sangue do grupo de controle (em vermelho) e neoplasia (em azul)	46
Figura 20: Espectro médio dos grupos controle e neoplasia com os números de onda selecionados (que serão utilizados no modelo CVA)	47
Figura 21: Projeção dos objetos na primeira variável canônica (CV1)	48
Figura 22: Gráfico de pesos dos números de onda selecionados utilizados na análise canônica de Fisher	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuições para as bandas Raman do corante Azul de Metileno de acordo com Aoki (2011)	40
Tabela 2: Atribuições das bandas Raman dos componentes majoritários do sangue humano e seus respectivos modos vibracionais de acordo com Rios (2018)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃ – Nitrato de prata

AgNPs – Nanopartículas de prata

AM – Azul de metileno

APTMS – 3-Aminopropiltriétoxissilano

CE – Câncer de endométrio

CT – (do inglês *Charge Transfer*) transferência de carga

CVA – Análise de variáveis canônicas de Fisher

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FEG – (do inglês *Field Emission Gun*) Microscopia eletrônica de varredura com emissão de elétrons

HCl – Ácido clorídrico

LSPR – (do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) ressonância plasmônica de superfície localizada

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaBH₄ – Borohidreto de sódio

NPs – Nanopartículas

SERS – Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície

SPR – (do inglês *Surface Plasmon Resonance*) Ressonância plasmônica de superfície

SPA – Algoritmo das projeções sucessivas

TRH – Terapia de reposição hormonal

UV-VIS – UV-Visível

kV – Quilo volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	17
3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN	19
3.2.1 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)	22
3.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA SERS	25
3.4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	27
3.4.1 Análise de componentes principais – PCA	28
3.4.2 Análise de variáveis canônicas de Fisher – CVA	28
3.4.3 Algoritmo das projeções sucessivas – SPA	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAIS	31
4.1.1 Amostras de Sangue	31
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 Síntese das nanopartículas de prata	33
4.2.2 Preparo das monocamadas de nanopartículas	33
4.2.3 Caracterização dos materiais	35
4.2.3.1 Espectroscopia UV-Visível	35
4.2.3.2 Espectroscopia Raman	35
4.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.2.4 Preparo das amostras para análise de espectroscopia Raman	36
4.2.4.1 Soluções de corante Azul de Metileno	36
4.2.4.2 Preparo das amostras de sangue	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs.....	36
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS PLASMÔNICOS.....	39
5.3 AZUL DE METILENO COMO MOLÉCULA SONDA.....	39
5.4 ESTUDO EXPLORATÓRIO UTILIZANDO SERS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	43

5.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	46
6 AVALIAÇÃO DO IMPACTO ECONÔMICO	49
7 IMPACTO DA PROPOSTA NA CADEIA TECNOLÓGICA	49
8 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer de endométrio é uma das doenças malignas do trato genital uterino mais frequentes em países desenvolvidos. Em 2020, foi o sexto câncer mais comumente diagnosticado no mundo, com 417 mil novos casos e 97 mil mortes (SUNG *et al.*, 2021). Sendo no Brasil, o sétimo tipo de câncer mais incidente entre as pessoas com útero. O número de casos novos esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, foi de 6.540 novos casos (INCA, 2019).

Segundo Caroline Laranjeira da Silva (Silva, 2019) o carcinoma endometrial é classificado em dois tipos histológicos principais: o tipo I, adenocarcinoma endometriode, que corresponde a 80 % dos casos e ocorrem principalmente na pré e perimenopausa, e o tipo II, que compreende adenocarcinoma de células claras e serosas, é menos frequente, porém responsável pelo maior índice de letalidade.

A obesidade é um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento deste tipo de câncer. Além do excesso de peso, Diabetes Mellitus Tipo II, síndrome do ovário policístico, excesso de estrogênio, a ovulação, menopausa tardia e menarca precoce também são fatores de risco. Há ainda uma correlação com a nuliparidade, hiperplasia endometrial, fatores hereditários e idade (Oliveira, 2021).

Em torno de 90% de pacientes com carcinoma de endométrio apresentam, como sintoma inicial, sangramento vaginal anormal, que pode ser pela mudança no padrão das menstruações, sangramento entre os ciclos ou após a menopausa. Outros sintomas que podem ser citados são, dor pélvica, massa anormal na pelve, perda de peso e corrimento vaginal branco ou amarelado na pós-menopausa (Silveira, 2017; Freitag *et al.*, 2023).

A partir do surgimento dos sintomas e visita ao médico, exames são solicitados para diagnosticar a doença. Entre esses exames podem incluir a ultrassonografia, a colposcopia, a histeroscopia, a curetagem uterina e biópsias. A histeroscopia apresenta maior precisão diagnóstica, entretanto é um procedimento invasivo e caro (Loffer, 2019).

O desenvolvimento de novos métodos de triagem baseados em evidências mais eficazes para a detecção precoce de cânceres ginecológicos tem sido o foco dos pesquisadores em oncologia. Um desses métodos é a partir do uso de biomarcadores sensíveis e específicos encontrados em biofluidos, como plasma, soro, urina ou saliva (Mabwa *et al.*, 2021).

As restrições das técnicas atuais de triagem e diagnóstico conduzem a necessidade de desenvolver métodos menos invasivos, mais baratos, mais rápidos e precisos para detectar biomarcadores cancerígenos. A espectroscopia vibracional pode fornecer análises rápidas, sem rótulos e objetivas para o domínio clínico. A análise espectroscópica de biofluidos, como componentes sanguíneos (soro e plasma), oferece a possibilidade de diagnóstico não invasivo por meio de marcadores ou assinaturas espectrais específicas (Baker *et al.*, 2016).

O uso da espectroscopia Raman na medicina é bastante amplo. A partir desta técnica é possível diagnosticar diferentes tipos de câncer, tais como, câncer de mama, pele, pulmão, próstata e laringe. Além disso, pode-se identificar placas de aterosclerose, estudar células, ácidos nucleicos, vírus e bactérias. Os picos característicos dos espectros Raman, para análises biológicas, encontram-se na região entre 1000 e 1800 cm^{-1} , que correspondem as vibrações das moléculas dos principais constituintes biomoleculares, também conhecida como região de impressão digital da molécula (Lobo *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Fabricar substratos plasmônicos constituídos de multicamadas de nanopartículas de prata e sua aplicação como substrato SERS no diagnóstico diferencial de câncer de endométrio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de prata;
- Sintetizar substratos plasmônicos formados a partir de monocamadas de AgNP sobre sílica;
- Caracterizar as AgNP's e os substratos plasmônicos;
- Demonstrar a eficácia da intensificação SERS nos substratos plasmônicos sintetizados usando como molécula sonda azul de metileno;
- Aplicar os substratos plasmônicos como superfície SERS ativa no diagnóstico diferencial de câncer de endométrio aliando SERS e métodos quimiométricos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Atualmente, câncer de endométrio (CE) é o sexto tipo de tumor maligno mais comum em pessoas com útero no mundo, em 2020 foram estimados cerca de 417 mil novos casos, com taxa de incidência de 8,70 por 100 mil pacientes (Ferlay *et al.*, 2021; Sung *et al.*, 2021). Nos Estados Unidos (EUA), desde 1972, o CE tem sido a doença genital entre pessoas com vagina mais comum. Segundo dados estatísticos da Sociedade Americana de Câncer, foram estimados para o ano de 2023 a ocorrência de 66.200 novos casos e 13.030 mortes como consequência deste tipo de cancro (Barakat, 1998; ACS, 2023). No Brasil, é o sétimo tipo de câncer mais incidente. Estimam-se 7.840 novos casos de CE, para o triênio de 2023 a 2025, correspondendo ao risco estimado de 7,08 casos novos a cada 100 mil pacientes. Quanto a mortalidade, em 2020, ocorreram 1.944 óbitos, com taxa bruta de mortalidade de 1,80 por 100 mil indivíduos (INCA, 2022).

Os fatores de risco, associados ao câncer de endométrio, mais conhecidos e estudados são a obesidade, diabetes e hipertensão. Também são considerados fatores de risco menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, anovulação crônica, irregularidade menstrual, hepatopatias crônicas e tumores ovarianos funcionantes. (Hobeika *et al.*, 2000). Conforme Barakat (1998) a exposição ao estrogênio endógeno pode estar relacionada à anovulação crônica como ocorre em síndromes como Stein-Leventhal ou tumores secretores de estrogênio, tendo como exemplo, tumor de células da granulosa do ovário.

O principal sintoma do câncer endometrial é o sangramento vaginal anormal como hipermenorreia, metrorragia e sangramento pós-menopausa. Outros sintomas que podem ser observados são a infertilidade, corrimento vaginal e dores pélvicas (Oliveira, 2021).

Cerca de 90 % dos casos de neoplasia endometrial ocorrem em pacientes com 50 anos ou mais. O risco de CE em pacientes na pós-menopausa é de 9 %, enquanto na pré-menopausa esse risco cai para 0,33 %. A diminuição de estrogênio na pós-menopausa causa diversos sintomas neurovegetativos e neuropsíquicos, tais como, ondas de calor excessivo, sudorese, insônia, diminuição da libido, falta de concentração. Para amenizar tais sintomas recomenda-se a Terapia de Reposição Hormonal (TRH), porém, é possível que ocorra, simultaneamente, outros efeitos sobre

os órgãos e sistema do organismo, tornando-se um fator patogênico no carcinoma endometrial (Clarke, M. A. *et al.*, 2018; Bitencourt, 2011).

Platz e Benda (1995) evidenciaram que a idade média das pacientes no momento do diagnóstico de câncer de endométrio é de 63 anos. Esta neoplasia é geralmente diagnosticada nos estágios iniciais, pois a maioria das mulheres relata sangramento vaginal pós-menopausa. A avaliação inicial inclui exame pélvico, esfregaço de Papanicolau e curetagem endometrial (Rose, 1996).

A ultrassonografia transvaginal no período peri e pós-menopausa é um método confiável de rastreamento de uma patologia endometrial, pois fornece dados para seguimento e conduta. Pode ser indicado também para pacientes que fazem TRH, pois, nesse caso, ocorre o crescimento endometrial. Em casos de espessamento do endométrio (superior a 4 mm) é obrigatório realizar outros métodos diagnósticos, tais como, histeroscopia, biópsia endometrial ou curetagem uterina (Reis, 2001).

A citologia endometrial não apresenta resultados satisfatórios para diagnosticar hiperplasias endometriais. Isso deve-se ao fato de que as amostras podem ser obtidas por três métodos: lavado, aspirado e escovado. Dessa forma, torna-se difícil diferenciar a hiperplasia de outras lesões disfuncionais nas amostras coletadas (Reis, 2001).

A histeroscopia, biópsia endometrial e curetagem são exames invasivos. Dentre eles, a histeroscopia possui maior precisão, porque a visualização intra-uterina possibilita um melhor diagnóstico, indicando o tratamento e o grau de disseminação. A biópsia endometrial não requer dilatação cervical ou anestesia e possui exatidão histopatológica de 87 a 100 %. O uso combinado da histeroscopia com biópsia endometrial é um excelente método diagnóstico para lesões disfuncionais e hiperplásticas, como também para câncer de endométrio, pois a visão endoscópica identifica lesões focais, indica o local onde a biópsia deve ser feita, assim como demais fatores prognósticos (Bitencourt, 2011).

A curetagem uterina é um procedimento clássico realizado na ausência de endoscopia, embora somente 60 a 75 % da superfície endometrial sejam retirados. Além do pior desempenho diagnóstico, a curetagem necessita de internação hospitalar, anestesia que, muitas vezes, é feita em pacientes que apresentam risco, tais como, diabetes, hipertensão, cardiopatas e obesidade, isso aumenta as chances de complicações cirúrgicas. Assim, a biópsia guiada por histeroscopia, com visão

direta da cavidade endometrial, é considerada o método padrão-ouro para o diagnóstico (Mota, 2018; Prota, 2001).

O diagnóstico precoce resulta em um prognóstico favorável da maioria dos casos, com uma taxa de sobrevida de 80 % (Amant *et al.*, 2005). Quando a suspeita do carcinoma é confirmada, exames adicionais são realizados para avaliar a classificação e extensão da doença, o que irá orientar a definição do tratamento (Amant *et al.*, 2018).

A Espectroscopia Raman está sendo utilizada em estudos biológicos. Diante disso, a espectroscopia, como técnica de biópsia óptica, proporciona a avaliação da composição bioquímica e morfológica do tecido ou fluido biológico em tempo real, tornando-se, desta forma, uma nova ferramenta para rápidos diagnósticos (Cartaxo, 2008; Lobo *et al.*, 2005).

3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A luz interage com a matéria de várias formas. A partir da interação luz-matéria, é possível determinar diversas propriedades do material tais como a composição. A espectroscopia Raman é uma das técnicas que usa esta interação luz-matéria para a caracterização molecular dos materiais. Espectroscopia Raman trata-se então de uma técnica de espectroscopia vibracional que fornece informações moleculares resultantes de um processo de espalhamento inelástico da luz. A radiação espalhada inelásticamente fornece informações vibracionais intra e intermoleculares fornecendo um espectro característico único de cada molécula (Anjos, 2023).

A espectroscopia Raman é uma técnica que se baseia no espalhamento inelástico de uma onda eletromagnética (luz) que incide em um sistema. Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma substância, parte da radiação é dispersa, da qual a maior parte dessa radiação dispersa apresenta a mesma frequência da radiação que incide (espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh), e apenas uma pequena fração possui uma frequência superior ou inferior relativa ao feixe incidente (espalhamento inelástico ou Raman). Isso ocorre em razão das colisões inelásticas entre os fótons e as moléculas que compõem o material em questão, ocasionando uma alteração dos níveis de energia vibracionais e rotacionais das moléculas (Araújo, 2014).

Em 1923, Smeakel previu o espalhamento Raman, porém, apenas em 1928 foi comprovado experimentalmente por cientistas de grupos distintos de pesquisadores

independentes: Raman e Krishnan na Índia e Landsberg e Mandelstam na Rússia. A descoberta do fenômeno foi atribuída ao primeiro grupo, e o efeito não somente foi nomeado, a fim de homenagear a Raman, como também foi designado o prêmio Nobel da Física em 1930. O primeiro espectrômetro comercial foi fabricado em 1953, após o desenvolvimento do monocromador, e utilizava fonte de mercúrio com comprimento de onda de 435,8 nm como fonte de excitação. Nos anos seguintes foram identificados muitos compostos usando essa configuração, entretanto a fonte de excitação utilizada dificultava a aplicação e reprodutibilidade dos experimentos. Em 1960, foi criado o laser introduzido pelos brasileiros Sérgio Porto e Wood em 1962, o qual passou a ser utilizado como fonte de luz em espectrômetros Raman, favorecendo uma aplicação mais rápida e reprodutível da espectroscopia Raman (Mitsutake, H.; Poppi, R.; Breitzkreitz, M., 2019).

O espalhamento Raman abrange uma transição entre um estado eletrônico da molécula e um estado virtual de maior energia, porém, com energia inferior ao estado eletrônico excitado subsequente, e retorno para o mais excitado vibracionalmente do estado eletrônico fundamental emitindo um fóton de energia menor que o fóton inicial. O espalhamento da luz resulta em perda ou ganho de energia pelo fóton, por meio da excitação dos modos vibracionais da molécula. A energia de um fóton é expressa pela Equação 1:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

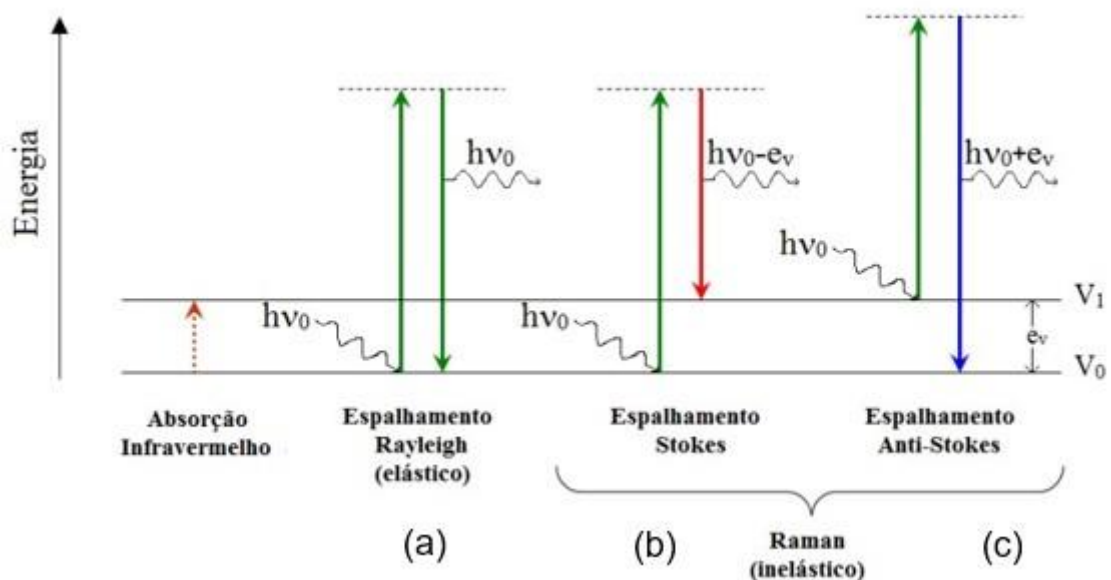
onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz no vácuo, λ o comprimento de onda do fóton e ν sua frequência. A diferença entre a energia absorvida e emitida coincide com a diferença de energia entre dois estados vibracionais do material e independe da energia absoluta do fóton (Anjos, 2023).

Em vista disso, considerando um fóton de energia $E = h\nu$ interagindo com uma molécula que se encontra em um estado vibracional de energia E_0 , podem ser gerados os seguintes tipos de espalhamento:

1. Espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh: a molécula que está no estado vibracional fundamental E_0 (estado normal de energia) absorve a energia total do fóton, passando para um estado eletrônico excitado, num nível energético maior, E_1 e retornando em seguida para o estado E_0 , reemitindo integralmente a energia que foi absorvida, como é apresentado na Figura 1(a);

2. Inelástico, ou espalhamento Raman – pode ocorrer de duas maneiras: Na primeira, quando a molécula interage com o fóton, absorve uma pequena quantia de sua energia antes de reemití-lo, de maneira que $h\nu_i - h\nu_e = h\Delta\nu$, que é a variação da energia que incide e a do fóton espalhado. Sendo assim, a molécula se encontra vibrando em um novo patamar de energia vibracional, E_{ex} , acima do seu estado vibracional normal, como é mostrado na Figura 1(b). Neste caso, onde a energia espalhada é menor do que a incidente, é chamado de Espalhamento Raman Stokes. Na segunda, antes de interagir com o fóton, a molécula já se encontra num estado vibracional de energia excitado E_{ex} , de modo que ao absorver a energia $h\nu_i$ do fóton, passa para um nível de energia virtual, $E_{virtual}$. Nesse patamar, a molécula reemite integralmente toda a energia em excesso, retornando ao estado vibracional normal. Dessa forma, a energia de espalhamento do fóton é $h\nu_e = h\nu_i + h\Delta\nu$, sendo assim, a energia espalhada é maior do que a incidente. Este caso é chamado de Anti-stokes e é mostrado na Figura 1(c) (Cartaxo, 2008).

Figura 1: Esquema ilustrativo dos tipos de espalhamento Raman.



Fonte: Haack, 2015.

A instrumentação utilizada na medição de espectros Raman consiste em quatro componentes principais: fonte de excitação, conjunto óptico com iluminação, unidade seletora de comprimento de onda e detector. Ademais, existem dois tipos de configurações do sistema coletor de luz, 90° e 180° . Na configuração de 90° , a luz

espalhada é coletada a partir da direção perpendicular da direção de excitação, enquanto na configuração de 180°, que também é denominada retroespalhamento, o sinal espalhado é coletado na direção oposta da direção de excitação. Diante disso, são necessários instrumentos ópticos adicionais, tais como o uso de um espelho dicróico, que reflete o sinal do espalhamento de onda mais longo e transmite o sinal do comprimento de onda mais curto (Li *et al.*, 2014).

A espectroscopia Raman se configura como uma técnica muito versátil. Vem sendo mundialmente utilizada como ferramenta para diversas aplicações científicas e industriais, tanto amostras químicas quanto biológicas podem ser analisadas por meio dessa técnica. Entre as vantagens da espectroscopia Raman se destaca a possibilidade de fornecer diferentes informações simultaneamente, visto que o espectro Raman de um composto mostra tanto os seus tipos de ligação, quanto a sua estrutura cristalina. (Sebben, 2021).

A intensidade do espectro Raman Normal entre outros mecanismos depende da concentração do analito na amostra. Sendo assim, concentrações muito baixas do composto não podem ser suficientes para gerarem um espectro Raman. Por isso, diferentes efeitos do espalhamento Raman estão sendo estudados, entre os quais destaca-se a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) que resulta em uma significativa melhora de sensibilidade (Sebben, 2021).

3.2.1 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)

A forma mais eficaz de amplificação do espalhamento Raman é a obtida pela espectroscopia de espalhamento Raman Intensificada por superfície (SERS). As intensificações no sinal Raman típicas do SERS são da ordem de $10^4 - 10^6$ comparadas com o Raman Normal. Os processos de intensificação combinados fornecem um sinal Raman de sensibilidade equivalente ou, em alguns casos, superior ao da fluorescência, técnica conhecida por ter uma alta seção de choque. Sensibilidade e seletividade elevadas, capacidade de identificar espécies moleculares, tornam a espectroscopia SERS uma ferramenta atraente para muitas aplicações em biociências (Bukowska, J.; Piotrowski, P., 2014).

A primeira observação do efeito SERS aconteceu em 1974 por Fleischmann *et al.*, na Universidade de Southampton. Entretanto, somente em 1977 o primeiro mecanismo deste fenômeno foi proposto por Jeanmaire e Van Duyne (Bukowska, J., Piotrowski, P., 2014).

O primeiro passo para a amplificação do sinal Raman é a utilização de nanopartículas (NPs). As NPs utilizadas no SERS são, em geral, feitas de metais nobres, como ouro, prata e cobre, os quais possuem propriedades ópticas únicas que intensificam o sinal Raman. As nanopartículas podem ser funcionalizadas com grupos químicos específicos que se ligam às moléculas alvo de interesse. Dessa forma, obtêm-se um método de detecção altamente seletivo e sensível para sistemas de poucas moléculas (Anjos, 2023).

Além da afinidade por moléculas-alvo, o tamanho e a forma das nanopartículas também podem afetar a eficácia da intensificação SERS. Nanopartículas menores tendem a ter maior razão área por volume, o que pode gerar uma maior intensificação do espalhamento Raman por apresentar uma maior quantidade de regiões de alta intensificação do campo eletromagnético. A forma e morfologia das nanopartículas também influenciam a intensificação do sinal SERS formando regiões conhecidas como *hot spots*. Esses locais produzem um aumento extraordinário do campo eletromagnético local, resultando em altos fatores de intensificação SERS (Israelsen, N.D.; Hanson C.; Vargis E., 2015).

O espalhamento Raman intrinsecamente fraco pode ser intensificado devido à interação entre três componentes do sistema: luz, molécula adsorvida e superfície metálica. Diante da natureza do efeito dois mecanismos têm sido utilizados para a explicação destas altas intensificações a saber: mecanismo eletromagnético e químico, sendo o mecanismo eletromagnético o de maior importância (Bukowska, J.; Piotrowski, P., 2014).

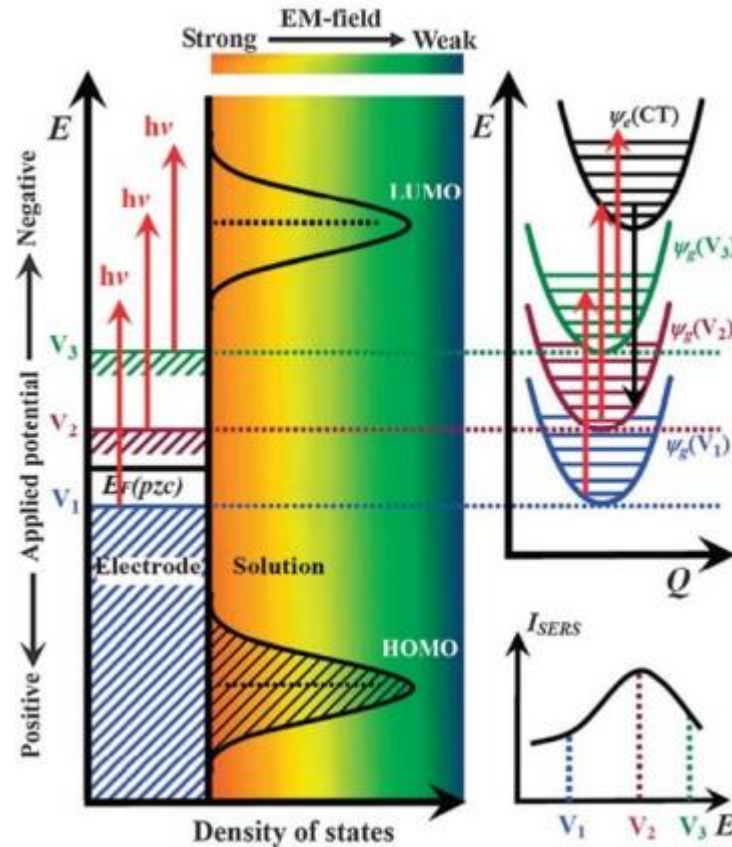
O mecanismo químico compreende a criação de novos estados moleculares em virtude da interação direta com o metal. O mecanismo eletromagnético refere-se ao campo elétrico, que é intensificado localmente na vizinhança do metal nanoestruturado (Anjos, 2023).

O mecanismo SERS compreende ao confinamento do campo eletromagnético nas nanoestruturas metálicas. O confinamento ocorre graças a ressonância dos plásmons de superfície localizados – LSPR, que gera um aumento do campo eletromagnético. A concentração do campo elétrico nas proximidades das nanopartículas é o que torna possível a detecção de baixas concentrações das moléculas de interesse (Anjos, 2023; Mejía *et al.*, 2018).

O mecanismo de ressonância de transferência de cargas, que é induzida pela radiação a laser, pode ser explicado a partir de um experimento eletroquímico-SERS

Souza (2015). Neste caso, é possível variar o nível de Fermi (E_f), por meio da variação do potencial elétrico aplicado ao eletrodo metálico e mantendo fixo o comprimento de onda da radiação incidente (Souza, 2015). Na Figura 2 é apresentado um diagrama que representa este tipo de experimento.

Figura 2: Diagrama esquemático do mecanismo de transferência de carga entre uma molécula adsorvida em um eletrodo metálico num sistema eletroquímico-SERS.



Onde, V_1 , V_2 e V_3 são os potenciais aplicados e $h\nu$ energia da radiação incidente.

Fonte: Souza, 2015

À esquerda têm-se o modelo conceitual da variação dos níveis de energia com a variação do potencial do eletrodo em processos de transferência de carga (CT). À direita os estados de energia relevantes envolvidos nos níveis eletrônicos e vibracionais no processo de CT. Por fim, à direita inferior, corresponde ao perfil de intensidade SERS – potencial aplicado. Nesta representação, observa-se que a aplicação do potencial V_1 é insuficiente para que o sistema atinja o nível de energia necessário para que ocorra CT. Dessa forma, a contribuição CT para o efeito SERS não seria significativa e apenas os demais mecanismos estariam atuando no efeito de intensificação SERS. Quando o potencial V_2 é aplicado, o nível de energia

para que ocorra a CT tem um valor de energia próximo da radiação excitante. Sendo assim, o sistema entra em ressonância, o que acarreta a intensificação do espalhamento Raman, para os modos vibracionais do cromóforo utilizado. Se o potencial aplicado for para valores inferiores, V_3 , a condição de ressonância CT não ocorre e há uma diminuição da intensidade SERS (gráfico inferior à direita na Figura 2) (Souza, 2015).

À vista disso, o aumento do sinal SERS está atrelado ao substrato nanoestruturado. Sendo assim, a preparação dos substratos nanoestruturados é essencial para as boas intensificações Raman, sendo que a contribuição da amplificação eletromagnética é dependente do tamanho, da forma e estrutura do material utilizado (Thaler, 2020).

3.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA SERS

Denominam-se nanomateriais partículas que possuem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, entre 1-100 nm. Segundo Conde *et al.*, 2014, a importância dessas estruturas para a ciência e tecnologia cresceu expressivamente nas últimas décadas, e isso ocorreu graças as suas propriedades ópticas.

A nanotecnologia destaca-se por seu caráter multidisciplinar, podendo ser aplicada em diversos campos, tais como, nanomedicina, armazenamento de energia, sensores, ciências dos materiais, ciência analítica, entre outros. No ramo científico, as nanopartículas ganham visibilidade pelas propriedades físico-químicas, que são diferentes de seus materiais na forma macroscópica (Domingos, 2020).

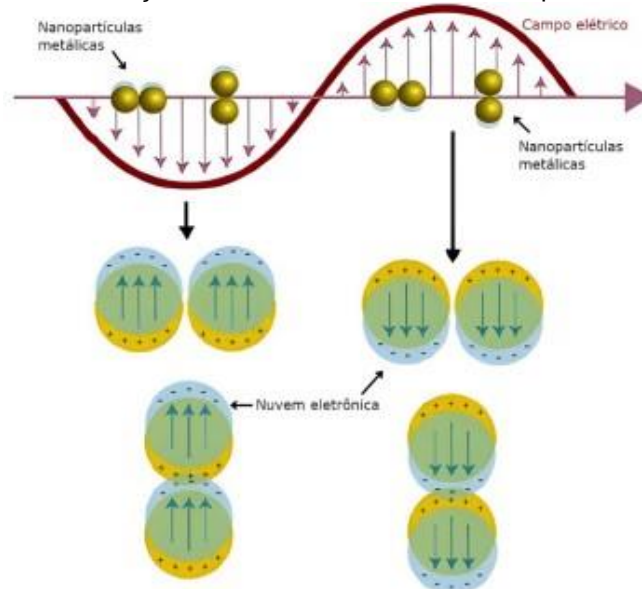
Os metais nobres, como ouro, prata e cobre, despertam fascínio na humanidade desde a antiguidade. No Egito antigo, em 3400 A.C., esses materiais tinham utilidades em seu estado natural, onde as primeiras moedas de ouro eram cunhadas e utilizadas pelos egípcios (Gioielli, 2018). Nos últimos anos, surgiram novos tipos de interesses por esses metais, tais como, o estudo de suas propriedades e o conhecimento das suas características (Gomes, 2018). Além disso, a utilização de nanopartículas destes elementos, principalmente ouro e prata, está sendo incorporada em diferentes tecnologias, graças as suas características ópticas e condutivas (Gioielli, 2018).

De acordo com Mayra Correia Domingos (2018), sob o ponto de vista eletromagnético, os metais são plasmas de estado sólido, e são constituídos por núcleos de íons positivos fixos e elétrons de condução móveis. Os estudos das

oscilações coletivas desse plasma e a sua excitação óptica está relacionado com um campo de estudo conhecido como plasmônica. Os metais nobres possuem elétrons livres, os quais tornam possível que ocorra oscilações eletrônicas coletivas por meio da excitação dos mesmos. A ressonância presente entre a oscilação de cargas superficiais e o campo eletromagnético da luz que incide constitui o que é chamado de ressonância de plasmon de superfície (SPR). (Domingos, 2018; Pereira, 2016).

Quando a ressonância está limitada em um pequeno volume, como por exemplo numa nanoestrutura metálica (com dimensões menores do que o comprimento da radiação incidente), ocorre a ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR), como é mostrado na Figura 3. Diante disso, existe um campo elétrico que está fortemente centrado na superfície das nanoestruturas dos metais, o qual oscila no tempo, com a mesma frequência da luz que incide (Pereira, 2016). O ouro e a prata agem de forma importante de acordo com as suas propriedades plasmônicas, visto que suas ressonâncias ocorrem na região do infravermelho (IV) e do visível do espectro eletromagnético, o que os torna importantes para diversas finalidades (Domingos, 2018).

Figura 3: Representação da excitação da ressonância localizada de plasmon de superfície (LSPR).



Fonte: (Anjos, 2023)

Atualmente, dentre as principais aplicações das nanopartículas de metais nobres destaca-se a produção de substratos para espectroscopia Raman intensificada por superfície. As características plasmônicas desses substratos dependem do material nanoparticulado que é feito (Gioielli, 2018). Esses metais são adequados

para utilização no efeito SERS porque possuem forte absorção na faixa de 400 a 1000 nm, que é a faixa da região do visível-infravermelho, que é a mais importante para o efeito. Sendo assim, ouro e prata são frequentemente utilizados em aplicações plasmônicas (Domingos, 2018).

3.4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Na química, a grande maioria dos resultados analíticos são apresentados como um conjunto de dados, que, por sua vez, são uma mistura de informação e ruído. Em alguns casos, a magnitude do ruído é tão grande quanto a informação e isso dificulta a possibilidade de encontrar resultados úteis. As soluções destes problemas são propostas pela quimiometria, pois a partir de modelos matemáticos somos capazes de: excluir o máximo de ruído dos conjuntos de dados; e extrair o máximo de informação possível dos dados multidimensionais. Portanto, a quimiometria é o campo da ciência responsável por extrair informações úteis de conjuntos de dados multidimensionais por meio de métodos matemáticos e estatísticos (Baranska, 2014).

Dependendo da natureza das informações a serem exploradas, podem ser consideradas dois tipos de análises, a exploratória de dados e reconhecimento de padrões. A análise exploratória de dados é empregada para resumir os padrões de uma matriz de dados, com o objetivo de avaliar as suas características, assim como a relação entre as amostras e as variáveis. Além disso, é o primeiro passo em um processo de classificação, que por sua vez é feito por métodos de reconhecimento de padrões. Dessa forma, dependendo da classe que as amostras pertencem, podem ser executados dois tipos de métodos de classificação: os de reconhecimento de padrões não supervisionados e os supervisionados (Sebben, 2021).

Os métodos de reconhecimentos de padrões não supervisionados são aqueles que não possuem conhecimento prévio dos dados, são empregados para verificar o potencial de padronização em um conjunto de dados. A análise dos componentes principais (PCA) é o método de reconhecimento de padrão não supervisionado mais utilizado. No que diz respeito as técnicas de reconhecimento de padrões supervisionadas, a análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) combina as propriedades da regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) com o potencial de discriminação de uma técnica de classificação. Sendo assim, utilizam a informação sobre associação de classe das amostras para um determinado grupo, para classificar amostras desconhecidas em uma das classes conhecidas (Sebben,

2021; Diniz, 2013). Ainda com relação as técnicas de reconhecimento de padrões supervisionadas, destaca-se a análise de variáveis canônicas de Fisher (CVA). A CVA é um método supervisionado, mas também é considerado um método exploratório.

3.4.1 Análise de componentes principais – PCA

A análise de componentes principais (PCA) foi introduzida por Karl Pearson em 1901. É um método utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor, todavia as relações entre as amostras não são afetadas. Dessa forma, as informações relevantes são separadas e tornam-se evidentes (Ferreira, 2015).

O PCA é um procedimento matemático que faz uso da ortogonalização de vetores para converter um conjunto de dados variáveis, que podem estar correlacionados entre si, em um grupo de valores variáveis que não se correlacionam linearmente, os quais são chamados de componentes principais (PCs). Cada PC é expressa como uma combinação linear das variáveis originais e irá explicar a variância que não foi estimada pelas PCs anteriores. Sendo assim, o PCA transforma um conjunto de dados original em duas matrizes, que são chamadas de escores (*scores*) e pesos (*loadings*). Os escores representam as coordenadas das amostras do novo conjunto, enquanto os pesos se referem ao coeficiente da combinação linear que descreve cada PC, ou seja, descrevem a maneira como as variáveis originais irão se correlacionar linearmente nas novas variáveis (PC) (Sebben, 2021).

3.4.2 Análise de variáveis canônicas de Fisher – CVA

Foi desenvolvida por Ronald Fisher, estatístico e biólogo inglês, no ano de 1936. O objetivo de Fisher era transformar dados multivariados de diferentes grupos de amostras, representadas pela matriz X , dando origem a novas variáveis designadas de variáveis canônicas, de maneira que a separação entre os grupos fosse maximizada. Esse método é considerado supervisionado, pois as amostras são atribuídas a diferentes grupos (Ferreira, 2022).

Assim como na PCA, essa é uma técnica exploratória de projeção, que torna possível a redução da dimensionalidade dos dados. A CVA utiliza informações da matriz X de dados sem seguir nenhuma forma de padrão na distribuição das populações ou dos grupos envolvidos (Ferreira, 2022).

As variáveis canônicas são dispostas em termos da sua importância, que diferentemente da PCA, não é a variância explicada, mas sim a separação em grupos pré definidos. Dessa forma, as variáveis canônicas mais importantes são usadas para adquirir a representação gráfica dos objetos. Comumente, duas ou três dimensões são eficientes para obter uma boa discriminação visual (Ferreira, 2022).

De acordo com Márcia Miguel Castro Ferreira (2022), na separação dos grupos, destacam-se dois fatores determinantes: 1) a distância entre eles e 2) o quão compacto são. Para satisfazer esses fatores, Fisher baseou-se na matriz da soma total de quadrados e produtos cruzados, SS_{total} . Essa matriz é capaz de descrever a dispersão global dos dados e, assim como na análise de variância, pode ser particionada na soma de duas matrizes, onde uma delas refere-se a dispersão dentro dos grupos, enquanto a outra descreve a distância entre os grupos. Sendo assim, as variáveis canônicas são derivadas dessas duas matrizes e representam as melhores combinações das variáveis originais que maximizam a razão da distância entre os grupos e a variância dentro dos mesmos.

A matriz X é considerada uma matriz de dados com dimensões $(I \times J)$, na qual os objetos I estão distribuídos em G grupos de diferentes populações, que por sua vez são caracterizados como g_1, g_2, \dots, g_G . O grupo 1 será formado por I_1 objetos que pertencem à população g_1 , o grupo 2 é constituído de I_2 objetos que pertencem ao grupo g_2 e assim sucessivamente tal que $I_1 + I_2 + \dots + I_G = I$. Dessa forma, a matriz SS_{total} , que é a soma total de quadrados e produtos e descreve a variância global dos dados é definida pela equação 2 (Ferreira, 2022).

$$SS_{total} = \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})^T = \dot{X}^T \dot{X} = (I - 1)S \quad (2)$$

onde \bar{x} é o vetor $(J \times 1)$ das médias das colunas da matriz X , \dot{X} é a matriz de dados centrada na média e S é a matriz de variância-covariância. A matriz SS_{total} pode ainda ser escrita como a soma de duas matrizes, $SS_{total} = W + B$, em que W e B representam as somas de quadrados e produtos dentro dos grupos, assim como as somas de quadrados e produtos entre os grupos, respectivamente. A matriz W , expressa pela equação 3, fornece uma medida da variabilidade dentro dos grupos e é obtida a partir da soma de quadrados e produtos de cada grupo individualmente, e em seguida, fazendo-se a soma para todos os grupos (Ferreira, 2022).

$$W = \sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} (x_{ig} - \bar{x}_g)(x_{ig} - \bar{x}_g)^T = \sum_{g=1}^G \dot{X}_g \dot{X}_g^T \quad (3)$$

sendo o vetor \bar{x}_g ($J \times 1$) o centroide do g -ésimo grupo dos quais elementos são as médias das colunas da matriz X_g de dimensões $(I_g \times J)$ e \bar{X}_g é a matriz de dados desse mesmo grupo centrada na média.

A matriz B , que representa a soma de quadrados e produtos entre os grupos é representada pela equação 4 (Ferreira, 2022).

$$B = \sum_{g=1}^G I_g (\bar{x}_g - \bar{x})(\bar{x}_g - \bar{x})^T \quad (4)$$

Na análise de variáveis canônicas de Fisher, o objetivo é encontrar a direção que maximiza a separação entre os grupos, ou seja, encontrar a direção no espaço multivariado na qual a diferença entre as médias dos grupos é a maior possível, quando comparada à variabilidade dentro dos grupos. Esse é um método de análise exploratória que, assim como ao das componentes principais, estabelece combinações lineares ótimas das variáveis originais (Ferreira, 2022). Além disso, para que o método possa ser aplicado é necessário calcular a inversa da matriz W e isso é um fator negativo quando existem matrizes nas quais o número de variáveis é maior que o número de amostras (é o que ocorre com dados espectrais), pois a matriz é singular e isso provoca instabilidade na determinação da sua inversa. Existem duas soluções possíveis para esse problema, fazer uma seleção de variáveis ou utilizar um método de compressão de dados que contenha o máximo da informação original, como a PCA. O algoritmo das projeções sucessivas (SPA) é uma técnica de seleção de variáveis amplamente utilizada (Ferreira, 2022; Soares *et al.*, 2013).

3.4.3 Algoritmo das projeções sucessivas – SPA

A seleção de variáveis é uma ação inicial importante na análise multivariada de dados. Isso porque se, o número de objetos é pequeno, o número de variáveis é grande e essas podem conter informação redundante ou ruidosa. Sendo assim, um procedimento preliminar de seleção de variáveis ou características é essencial para que não ocorra o problema de sobreajuste (*overfitting*). O sobreajuste acontece quando o ruído é modelado e dessa forma o modelo não tem a capacidade de generalização. Logo, a seleção de variáveis apresenta muitas vantagens, como a remoção de não linearidade e de ruído, quando comparado ao uso do espectro completo, por exemplo (Diniz, 2013).

No SPA, a seleção de variáveis é moldada como um problema de otimização combinatória com restrições. Diz-se que é restrita porque a busca é restrita a um

número reduzido de subconjuntos de variáveis, os quais são formados conforme uma sequência de operações de projeção envolvendo a matriz de respostas instrumentais. Dessa forma, esse algoritmo apresenta a vantagem de encontrar um conjunto representativo de variáveis com um nível mínimo de colinearidade (Soares *et al.*, 2013; Canova, 2023).

De acordo com Luciana dos Santos Canova (2023), o SPA é um método iterativo de seleção direta, o mesmo opera na matriz de resposta instrumental, escolhendo as variáveis que são minimamente redundantes, resolvendo os problemas de colinearidade. A seleção de variáveis inicia com uma variável, em seguida incorpora uma nova a cada iteração, até que um número específico N de variáveis seja alcançado (Canova, 2023).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os reagentes que foram utilizados neste trabalho são listados abaixo.

- AgNO₃ (Sigma Aldrich; ≥ 99 %);
- NaBH₄ (Sigma Aldrich; ≥ 98 %);
- Água ultrapura (18,2MΩ.cm, Milli-Q) foi utilizada no preparo das soluções da síntese de AgNPs;
- Álcool Etílico Absoluto (Neon; p.a);
- 3-Aminopropiltrietoxissilano (APTMS) (Sigma Aldrich; 99 %);
- Água deionizada;
- HCl (Sigma Aldrich; 37 %);
- Corante AM (Sigma Aldrich).

4.1.1 Amostras de Sangue

Este trabalho foi um projeto que ocorreu em colaboração com o Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo como responsável o Professor Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho a aluna de doutorado Ana Rita Peixoto Panazzolo vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina. As questões éticas quanto a seleção das pacientes e coleta foram depositadas no comitê

de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

As amostras de sangue utilizadas para o teste dos substratos plasmônicos foram coletadas de 12 pacientes diagnosticadas com câncer de endométrio e 11 pacientes pertencentes ao grupo controle. Tanto o grupo de caso quanto o grupo de controle seguiram critérios de inclusão e exclusão.

No que diz respeito ao grupo de caso, foram incluídas mulheres acima de 50 anos, na pós-menopausa com diagnóstico de câncer endometrial num período de até 60 dias. Excluiu-se pacientes que fazem uso de terapia hormonal ou de tamoxifeno, pacientes com tumores em outros órgãos, ainda que já tenham feito tratamento. Além disso, também foram excluídas pacientes em uso de terapia imunossupressora, com câncer de colo uterino ou endocervical, assim como pessoas que já fazem tratamento para câncer endometrial.

Com relação ao grupo de controle, participaram pacientes acima de 50 anos na pós-menopausa que passaram por exame de histerectomia por prolapso uterino, que possuíam endométrio atrófico confirmado no estudo anatomopatológico. Além disso, participaram mulheres acima de 50 anos na pós menopausa, diagnosticadas com atrofia endometrial por meio de histeroscopia com biópsias. Da mesma forma que no grupo de caso, foram excluídas aquelas que fazem uso de terapia hormonal ou de tamoxifeno, pacientes com tumores nos demais órgãos, mesmo que já tratadas, pacientes que fazem terapia imunossupressora, assim como pacientes com pólipos endometriais ou outras patologias benignas de endométrio.

O material biológico foi coletado antes dos procedimentos clínicos, tais como, cirurgia oncológica (grupo de caso), histerectomia vaginal (grupo de controle), ou depois do diagnóstico histeroscópico, tanto para as pacientes de caso quanto de controle. Foram coletadas alíquotas de sangue de 4 mL em tubos contendo anticoagulante (EDTA). As coletas das amostras ocorreram no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago.

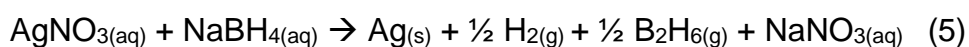
As amostras além de serem coletadas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, também foram preparadas em laboratório desse hospital. Após o preparo, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer, mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até posterior análise espectroscópica. O transporte das amostras até o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ocorreu por meio de transportadora especializada.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese das nanopartículas de prata

As AgNPs foram sintetizadas pelo método de redução química, relatado por Mulfinger *et al.*, 2007. Nesse procedimento, é necessário utilizar um excesso de borohidreto de sódio, tanto para reduzir a prata, quanto para estabilizar as nanopartículas de prata que se formam. A reação química envolvida é apresentada na Equação 5.

Foi adicionado um volume de 25 mL de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) 1,0 mM gota a gota (cerca de uma gota por segundo) a 75 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio 2,0 mM, a qual foi resfriada a 10 °C em banho termostático. A mistura reacional foi agitada vigorosamente com o auxílio de uma placa de agitação magnética. A solução, que inicialmente era incolor, tornou-se amarelo brilhante quando todo nitrato de prata foi adicionado, em seguida a agitação foi interrompida e a barra de agitação removida. A solução coloidal amarela foi armazenada em um frasco de vidro e mantida sob refrigeração.



4.2.2 Preparo das monocamadas de nanopartículas

A construção dos filmes finos de prata sobre slides de vidro seguiu a metodologia reportada previamente (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Para a obtenção do substrato plasmônico foram utilizadas lâminas de sílica fundida de baixa rugosidade e alta transparência. Inicialmente, as lâminas de vidro ficaram imersas em álcool etílico absoluto em banho ultrassom durante 10 minutos, como processo de limpeza. Após isso, foram colocadas em uma solução etanólica de 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) 10 mmol/L por 24 horas, com aquecimento a 60 °C durante as primeiras duas horas e mantidas à temperatura ambiente no restante do tempo. Na sequência, lavou-se as lâminas modificadas com etanol, a fim de remover o excesso de APTMS não adsorvido, e as mesmas foram colocadas sobre uma chapa de aquecimento à 120 °C por duas horas como processo de cura. Então, foram imersas imediatamente em solução de AgNPs durante 24 horas, para que houvesse a formação de um filme de AgNPs sobre a superfície do vidro. Esta etapa é apresentada na Figura 4. Após as lâminas foram removidas da solução de nanopartículas e submergidas em 10 mL de solução aquosa contendo 120 μL de

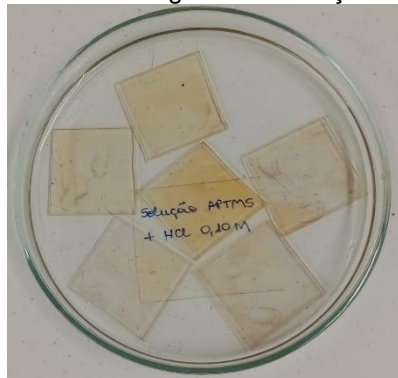
APTMS 10 mmol/L e 100 μ L de HCl 0,10 mol/L durante 20 minutos, após lavou-se, cuidadosamente, com água deionizada e depois imersas novamente na solução de AgNPs por 1 hora. Esse processo de revezamento das soluções foi repetido quatro vezes, totalizando cinco ciclos de formação das monocamadas de AgNPs. Os slides de sílica imersos na solução de APTMS e HCl são apresentados na Figura 5. Os substratos contendo filme de nanopartículas de prata são apresentados na Figura 6.

Figura 4: Imagem das lâminas de vidro imersas na solução coloidal AgNPs.



Fonte: autoria própria.

Figura 5: Imagem das lâminas de vidro submergidas em solução de APTMS e HCl 0,10 mol/L.



Fonte: autoria própria.

Figura 6: Imagem dos substratos após os cinco ciclos de deposição das AgNPs.



Fonte: autoria própria.

4.2.3 Caracterização dos materiais

4.2.3.1 Espectroscopia UV-Visível

Para constatar a formação das AgNPs de maneira simples, foi empregado o uso da espectroscopia UV-VIS. A solução coloidal foi analisada com um equipamento Cary® 100 UV-VIS – Agilent dentro de uma cubeta de quartzo 1x1 cm² com uma faixa de comprimentos de onda de 200 – 800 nm.

Para o acompanhamento da impregnação das AgNPs, foi utilizado o equipamento Cary® 5000 UV-VIS, localizado no Laboratório de Espectroscopia Laser e Filmes Ópticos do Instituto de Física da UFRGS. A faixa de comprimentos de onda utilizada foi de 330 – 800 nm.

4.2.3.2 Espectroscopia Raman

Para caracterização e aplicação dos substratos plasmônicos como substratos SERS utilizou-se um equipamento NanoRaman da Horiba com radiação de excitação em 532 nm e 632.8 nm utilizando rede de difração de 600 mm e potência a depender do experimento realizado.

4.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização estrutural das nanopartículas de prata sintetizadas, foi realizada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de detecção de elétrons secundários. O equipamento utilizado foi o microscópio Zeiss Auriga com fonte de elétrons do tipo FEG as imagens foram obtidas com diferentes

magnificações e aceleração de feixe 5,0 kV. O tamanho das nanopartículas foi medido utilizando o software livre ImageJ & Eliceiri, K. (2021). ImageJ Ops [Software]. <https://imagej.net/Ops>.

4.2.4 Preparo das amostras para análise de espectroscopia Raman

4.2.4.1 Soluções de corante Azul de Metileno

Foram preparadas soluções de concentrações de AM 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} mol/L. Foi utilizado o corante em pó diluindo esse em água ultrapura. Com o auxílio de um micropipetador, foi pipetado 50 μ L de cada solução e esse volume foi depositado sobre a superfície do substrato plasmônico, como é demonstrado na Figura 7, para posterior caracterização desse material.

Figura 7: Deposição das diferentes concentrações de solução corante AM sobre a superfície do substrato plasmônico.



Fonte: Autoria própria.

4.2.4.2 Preparo das amostras de sangue

Como foi mencionado na seção 4.1.1, as amostras de sangue foram armazenadas a -80 °C até serem analisadas; antes da análise espectroscópica, as amostras foram deixadas para descongelar à temperatura ambiente, por cerca de uma hora. Foi depositado um volume de 50 μ L de cada amostra sobre a superfície do substrato e as mesmas foram deixadas para secar ao ar por aproximadamente 1 hora. A deposição sobre o substrato plasmônico ocorreu de modo análogo ao apresentado na Figura 7.

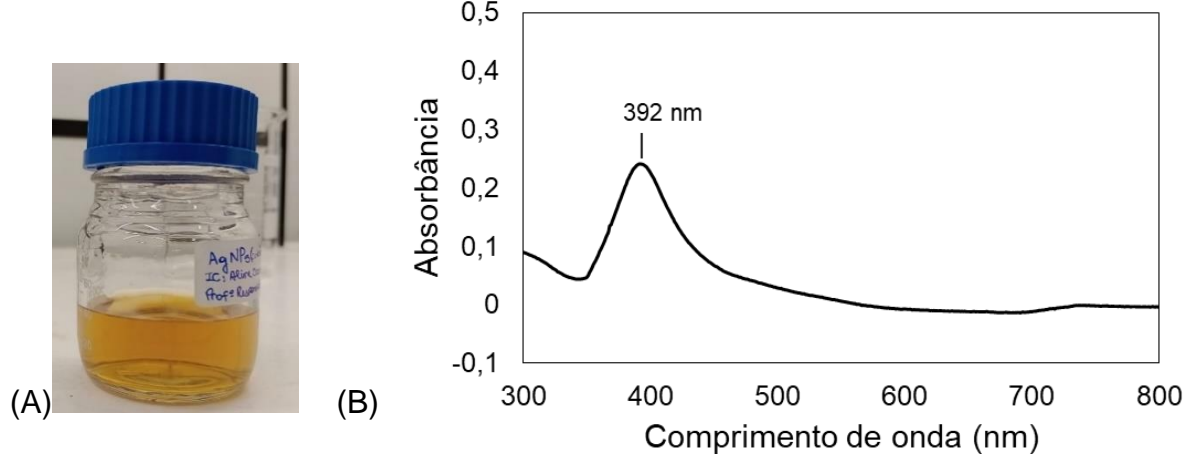
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs

A solução coloidal de nanopartículas de prata foi preparada conforme descrito na seção 4.2.1, fornecendo uma solução de coloração amarela (Figura 8). O coloide

de AgNPs foi caracterizado por espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível. O espectro de absorção no UV-VIS das AgNPs é apresentado na Figura 8. Observa-se um máximo de absorção em 392 nm, que é característico da excitação de SPR em NPs de prata esferoidais com tamanhos menores do que 50 nm.

Figura 8: Imagem da solução coloidal de nanopartículas de prata sintetizada (A) e Espectro da absorção UV-VIS da solução coloidal de AgNPs (B).

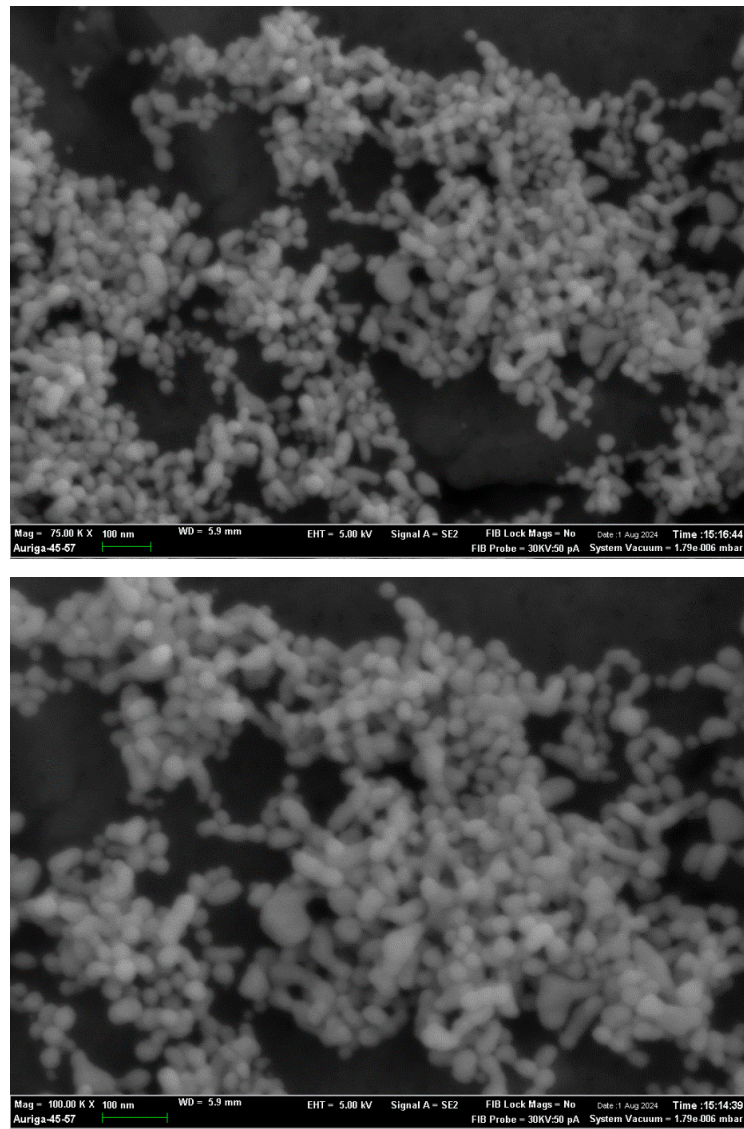


Fonte: autoria própria.

É possível observar que a banda de absorção não mostra nenhuma assimetria, o que indica a presença de nanopartículas majoritariamente esféricas de tamanho uniforme e ausência de agregados maiores de NPs, que causam uma assimetria dessa absorção para maiores comprimentos de onda (Oliveira, 2015).

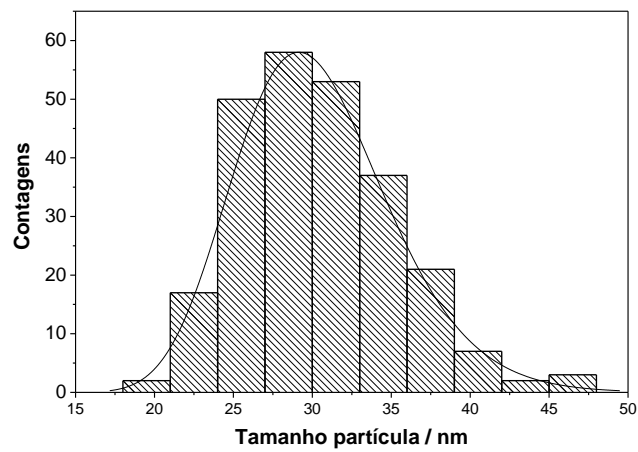
Na Figura 9 é apresentada imagens MEV das nanopartículas sintetizadas e na Figura 10 o histograma da distribuição de tamanhos. A partir das figuras é possível observar partículas predominantemente de formato esféricos e tamanhos de 30 ± 5 nm.

Figura 9: Imagens de microscopia de varredura das AgNPs sintetizadas.



Fonte: autoria própria.

Figura 10: Histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs.

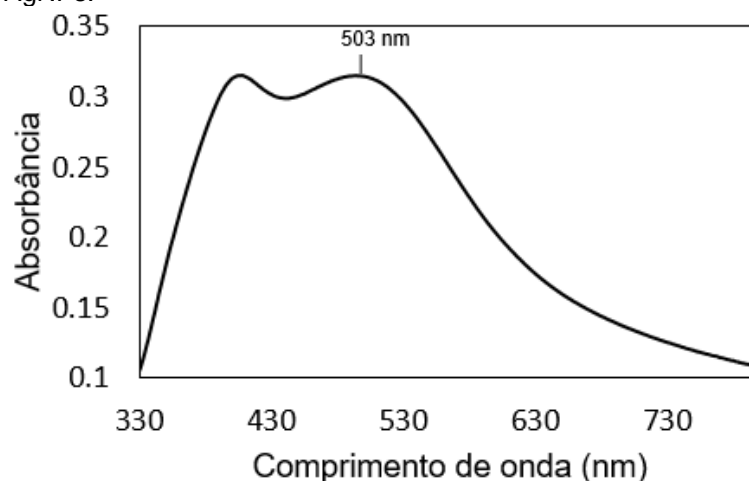


Fonte: autoria própria.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS PLASMÔNICOS

Como mencionado na seção 4.2.2, para ligar quimicamente o vidro com as AgNPs, foi utilizado APTMS para promover a adsorção química (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Dessa forma, o objetivo da medida de absorção dos substratos plasmônicos foi confirmar que a mudança de aspecto das amostras está relacionada com a deposição de filmes de AgNPs e não somente de APTMS ou outro reagente utilizado. A teoria de Maxwell-Garnet prevê que um aumento no índice de refração local faz com que o máximo da banda LSPR desloque-se para maiores comprimentos de onda (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Como nos substratos as NPs estão agregadas, enquanto em solução estas encontram-se dispersas individualmente, espera-se que ocorra um aumento na intensidade da banda plasmônica. A Figura 11 apresenta o espectro de absorção do substrato plasmônico. É possível observar um deslocamento para um maior comprimento de onda, quando comparado com o espectro da solução coloidal (Figura 8). Dessa forma, observa-se que ocorreu a formação de filmes múltiplos de nanopartículas, isso foi evidenciado pelo desvio do $\lambda_{\text{máx}}$, em torno de 503 nm, associado ao acoplamento de plasmons entre as nanopartículas metálicas (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019).

Figura 11: Espectro de absorção UV-VIS do substrato plasmônico formado pela deposição das monocamadas de AgNPs.



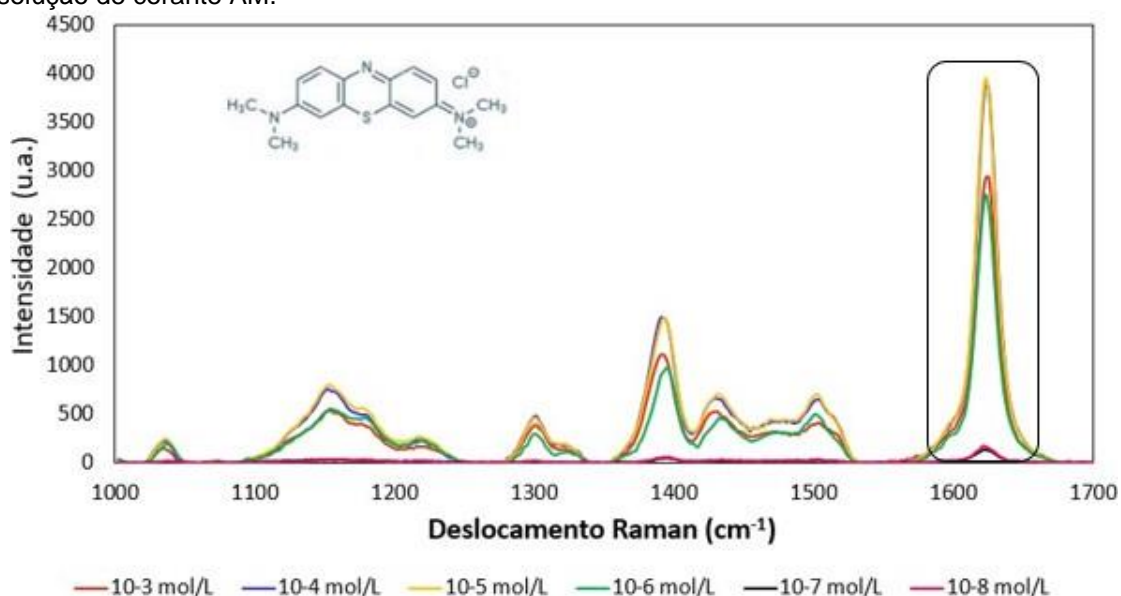
Fonte: autoria própria.

5.3 AZUL DE METILENO COMO MOLÉCULA SONDA

Foi avaliada a possibilidade de aplicação dos materiais produzidos como substratos SERS ativo. Para isso, utilizou-se diferentes concentrações de solução de

corante azul de metileno. Os testes foram realizados com uma amostra contendo as nanopartículas de prata e foram testadas soluções de concentrações de AM 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} mol/L e seus espectros são apresentados na Figura 12. Observa-se na figura que a intensidade das bandas não segue necessariamente a concentração da amostra tendo em vista que nos espectros SERS a flutuação de intensidades é algo característico devido à natureza de intensificação do campo eletromagnético local. De acordo com Aoki (2011), os sinais mais característicos do AM são aqueles que aparecem em 1622 , 1394 e 446 cm^{-1} . As atribuições para as principais bandas Raman do AM são apresentadas na Tabela 1.

Figura 12: Espectros Raman obtidos dos substatos sintetizados utilizando diferentes concentrações de solução de corante AM.



Fonte: autoria própria.

Tabela 1: Atribuições para as bandas Raman do corante Azul de Metileno de acordo com Aoki (2011).

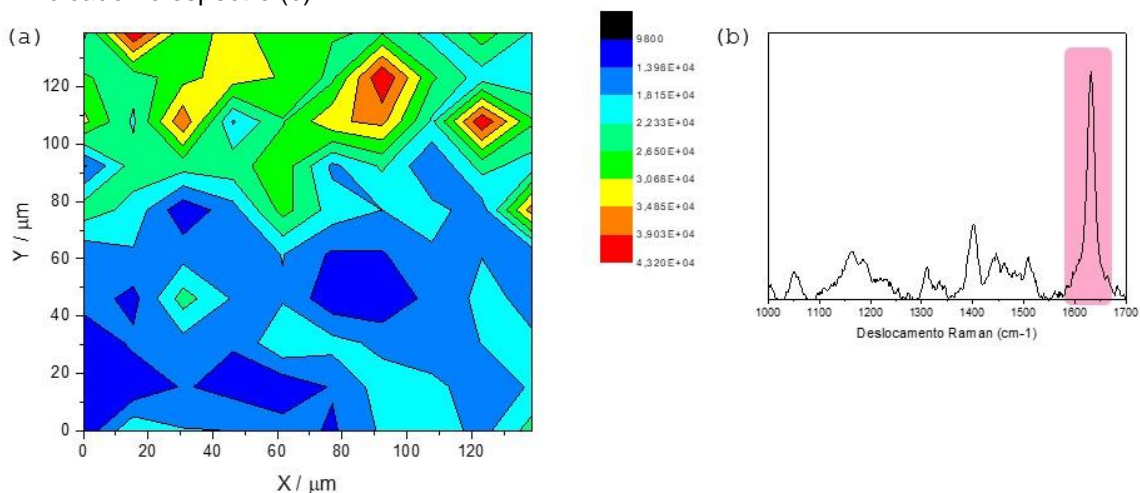
Raman Experimental (cm^{-1})	Atribuições
446	Deformação esqueleto (CN, CS e CH_3) / Deformação esqueleto CN
1394	Estiramento simétrico CN (lateral e centro) + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH_3), estiramento CN + estiramento CC / estiramento antissimétrico CN
1622	Estiramento CC + CH bending no plano (anel) / estiramento CN + estiramento CC

Fonte: Aoki (2011)

Como mencionado, a qualidade do substrato foi testada utilizando diferentes concentrações de solução de corante AM, analisando principalmente a banda em torno de 1620 cm^{-1} , que é atribuída conforme indicado na Tabela 1. Observa-se, na Figura 11, que até para concentrações muito baixas, tais como 10^{-7} e 10^{-8} mol/L observa-se a banda característica do AM, em torno de 1620 cm^{-1} informação espectral que não é obtida quando analisa-se por Raman normal a partir de soluções diluídas de mesma concentração do composto (dados não apresentados). Estes resultados indicam que o substrato sintetizado se mostra como um bom substrato SERS.

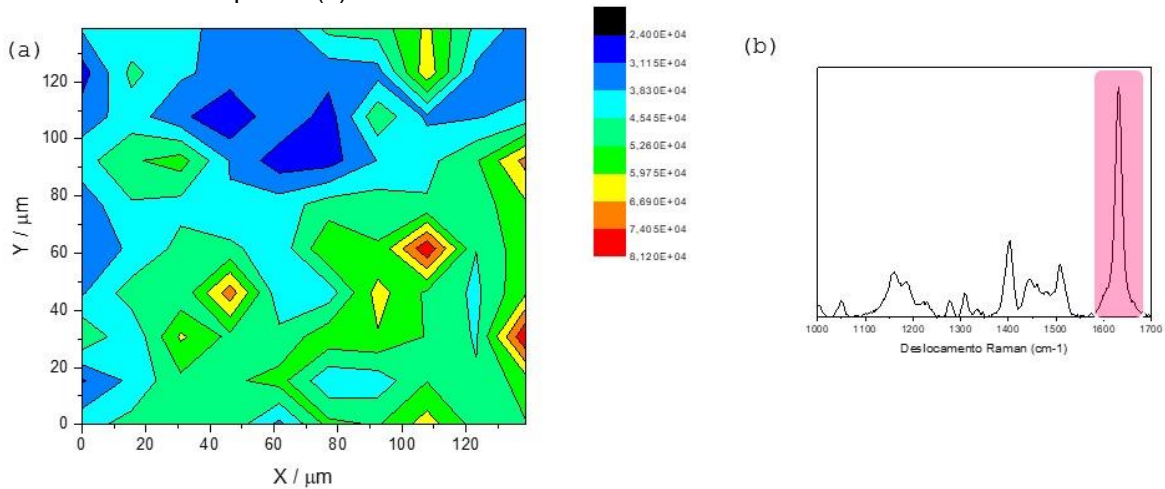
Para confirmar a eficiência do substrato como substrato SERS ativo foram feitas análises em diferentes pontos de determinada área do substrato, utilizando o método de mapeamento que pode ser obtido com o microscópio Raman Confocal HORIBA para a solução mais diluída. Foram analisadas três diferentes áreas da amostra. Nas Figuras 13, 14 e 15 são apresentados os resultados obtidos para o mapeamento de diferentes áreas da amostra usando a menor concentração de AM.

Figura 13: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 1 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b).



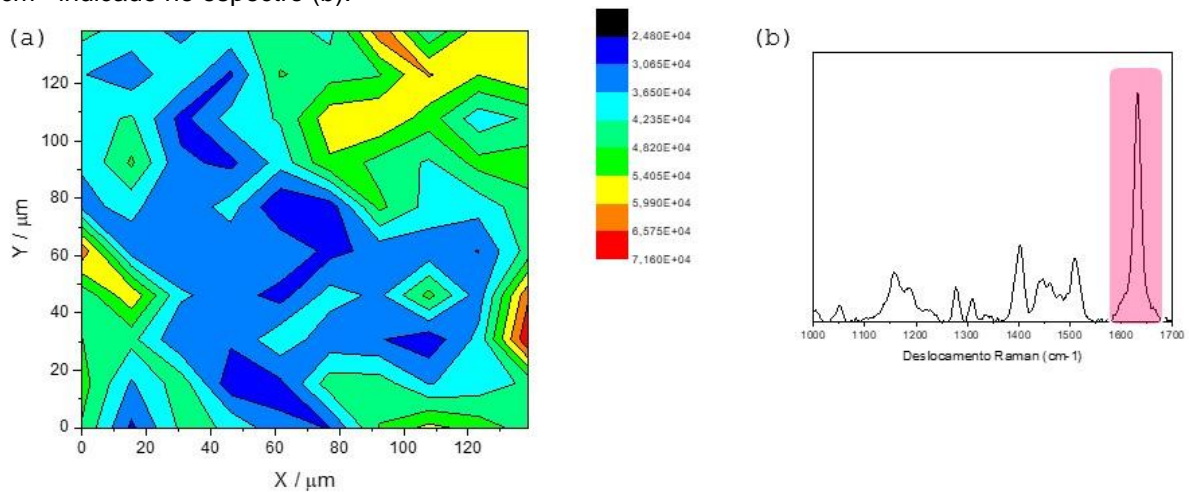
Fonte: autoria própria.

Figura 14: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 2 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b).



Fonte: autoria própria.

Figura 15: Mapeamento SERS utilizando como molécula sonda azul de metileno (10^{-8} mol/L) para a área 3 analisada (a). A imagem apresentada foi obtida a partir da integração do modo vibracional 1622 cm^{-1} indicado no espectro (b).



Fonte: autoria própria.

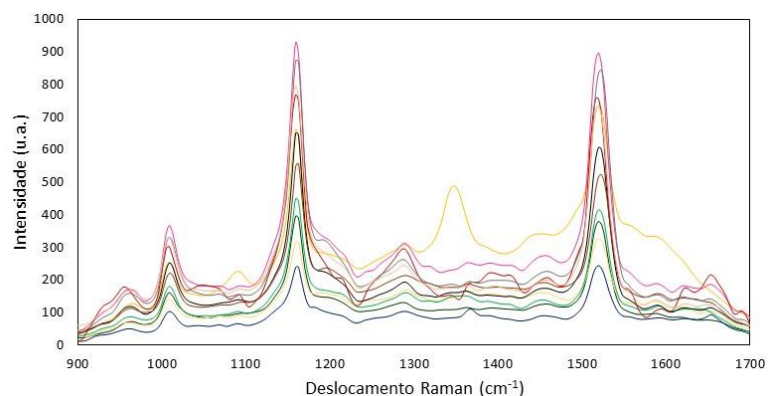
A partir das imagens obtidas, é possível observar que o mapeamento indica a intensidade do modo vibracional utilizado como referência (em torno de 1620 cm^{-1}). Além disso, é possível fazer duas observações importantes: (1) para toda área analisada obteve-se pelo menos valores de intensidade acima de 1000 (azul escuro), o que indica a ausência de regiões com sinal Raman inexistente (cor preta); (2) dentro da área analisada é possível verificar uma grande variação da intensidade SERS, indicada pelas cores vermelho escuro, amarelo, azul. Isto é comum em análises SERS, uma vez que a intensificação do espalhamento Raman depende dos *hot spots*,

formados a partir dos agregados de nanopartículas que apresentam uma densidade de campo eletromagnético muito mais elevada (Aoki, 2011). Portanto, esta falta de uniformidade (flutuação no sinal) depende da natureza local das nanopartículas. Como trata-se de monocamadas de AgNPs, que estão arranjadas de modo aleatório, haverá regiões que serão mais eficazes em intensificar o espalhamento Raman. Apesar disso, os resultados indicam que as superfícies plasmônicas sintetizadas são eficientes em intensificar o sinal Raman, permitindo a obtenção de sinal para concentrações tão baixas quanto 10^{-8} mol/L.

5.4 ESTUDO EXPLORATÓRIO: UTILIZANDO SERS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

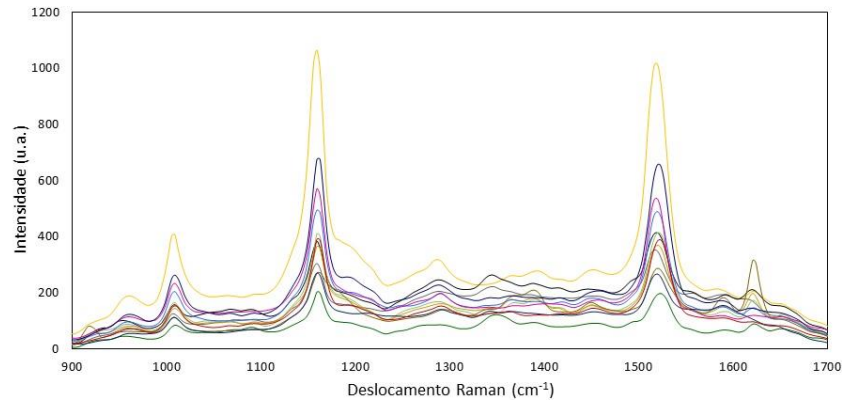
Uma vez que foi verificada a eficiência dos substratos SERS, as amostras de sangue foram analisadas por meio da espectroscopia Raman. A identificação e diferenciação das amostras é realizada a partir das bandas consideradas características de cada composto. Dessa forma, é possível caracterizar o espectro de uma substância relacionando com os principais modos vibracionais de uma amostra referência. Pode-se dizer que os espectros são como uma impressão digital do composto (Rios, 2018). A Figura 16 mostra o espectro Raman para as amostras de sangue do grupo de controle. Na Figura 17, é apresentado os espectros Raman das amostras de sangue de pacientes com câncer de endométrio. Além disso, os espectros representativos das amostras do soro sanguíneo de pacientes com neoplasia endometrial e do grupo de controle estão representados na Figura 18.

Figura 16: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo de controle.



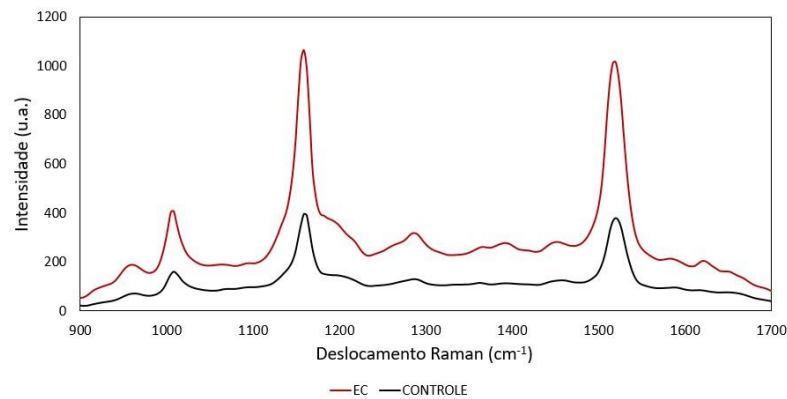
Fonte: autoria própria.

Figura 17: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo de pacientes com câncer de endométrio.



Fonte: autoria própria.

Figura 18: Espectros Raman das amostras de sangue do grupo controle e neoplasia.



Fonte: autoria própria.

De acordo com Santos (2020) o sangue compõe-se de uma parte líquida, o plasma, que contém em torno de 90 % de água, além das hemácias (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos), e plaquetas. A hemoglobina (Hb) é o principal cromóforo no sangue e pode se apresentar de diferentes formas: sem oxigênio, conhecida como desoxi-hemoglobina (desoxiHb) e saturado de oxigênio, chamada de oxi-hemoglobina (HbO₂). Cada molécula de hemoglobina humana é constituída de quatro hemes contendo cadeias polipeptídicas. O grupo heme é formado por quatro anéis pirrólicos ligados a um átomo central de ferro. Além disso, o ferro forma duas ligações adicionais, uma em cada lado do plano do grupo heme (Santos, 2020). Na Tabela 2, são descritas as principais bandas de absorção referentes aos constituintes do sangue humano.

Tabela 2: Atribuições das bandas Raman dos componentes majoritários do sangue humano e seus respectivos modos vibracionais de acordo com Rios (2018).

Número de onda	Modo vibracional	Componente
1003	Respiração do anel aromático	Fenilalanina
1076	Vibração (C–O)	Ácido láctico
1124	CH ₃ <i>rocking</i> , vibração (C–O), estiramento assimétrico (C–O–C)	Lactato, polissacarídeos, grupo heme
1170	Estiramento (C–C)	Hemoglobina
1225	Rotação de spin (Fe), β- folha, vibração da ligação no plano C _m -H	Hemoglobina
1248	Amida III	Fibrina, Guanina, Citosina
1340	Ligação (C–H)	Triptofano
1374	Estiramento simétrico (CH ₃)	Grupo heme
1399	Estiramento assimétrico (C=N)	Grupo heme
1449	Ligação (CH ₂ ,CH ₃)	Triptofano
1563	Estiramento e vibração do anel pirrólico, vibração (C _β C _β)	Hemoglobina
1580	Estiramento (C=C)	Grupo heme
1583	Ligação (C–H)	Hemoglobina
1620	Vibração (C=C)	Grupo heme
1654	Amida I	Proteínas

Onde, subscritos α , β , representam os átomos de carbono na posição alfa, beta da porfirina; a e b corresponde a grupos de carbono vinílicos; c e d aos carbonos de propionato. Fonte: Rios, 2018.

Como pode ser observado nas Figuras 16, 17 e 18, os espectros Raman apresentam bastante informação vibracional. É possível identificar os componentes presentes no sangue, como a hemoglobina (1170, 1225, 1583 cm⁻¹), o aminoácido triptofano (1340, 1449 cm⁻¹), assim como o modo vibracional relacionado a presença de proteínas, amida III, o aminoácido fenilalanina (1003 cm⁻¹), o ácido láctico e lactato (1076 cm⁻¹), o grupo heme (1374, 1580 cm⁻¹) e o modo da amida I (1654 cm⁻¹). Embora algumas regiões espectrais sejam visualmente semelhantes, o uso da análise

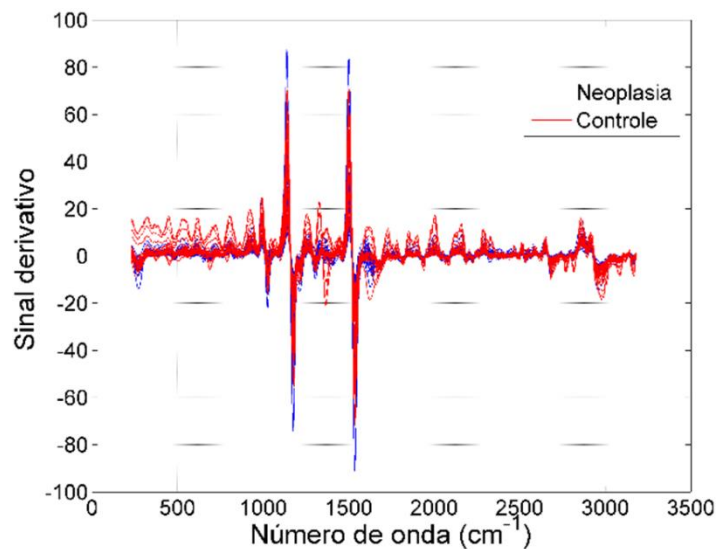
quimiométrica é indispensável para superar a interpretação visual que é imprecisa. Dessa forma, aliar métodos quimiométricos a informação espectral é útil na interpretação das respostas analíticas, visto que essas são complexas e difíceis de interpretar por simples inspeção dos espectros.

5.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Como foi discutido na seção 3.4.3, o pré-tratamento de dados é necessário antes da análise de dados multivariados. Visto que, dados digitais, como os espectros Raman, são sinais sequenciais no tempo, que podem apresentar informação redundante ou ruidosa. Sendo assim, é fundamental eliminar a não linearidade dos espectros, assim como o ruído, afim de extrair a informação analítica relevante (Diniz, 2013).

Os espectros Raman foram adquiridos na faixa de 200-3200 nm. A fim de remover características de linha de base indesejáveis, os espectros da primeira derivada foram calculados usando um filtro Savitzky-Golay com um polinômio de segunda ordem e uma janela de 15 pontos. Na Figura 19, são apresentados os espectros derivados para o grupo de controle (em vermelho) e neoplasia (em azul).

Figura 19: Espectros derivados para as amostra de sangue do grupo de controle (em vermelho) e neoplasia (em azul).



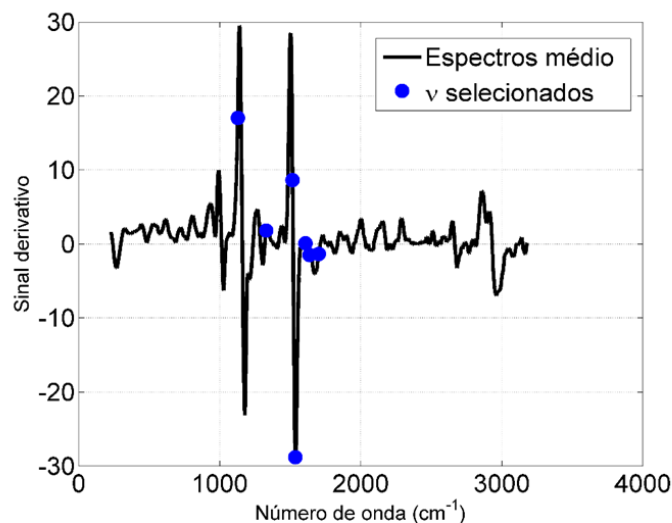
Fonte: autoria própria.

Como foi mencionado na seção 3.4.2, a análise canônica de Fisher (CVA) produz uma combinação linear das variáveis originais (números de onda), com o

propósito de tornar as amostras de um grupo mais semelhantes entre si e mais distintas de amostras pertencentes a outros grupos, maximizando a variância intergrupos, ao passo que minimiza a variância intragrupo. Devido às limitações matemáticas, a CVA não é capaz de operar com dados que possuem muitas variáveis correlacionadas, que é o que ocorre com dados espectrais, sendo assim, faz-se necessário o uso do algoritmo das projeções sucessivas (SPA), para selecionar os números de onda mais representativos. Dessa forma, é possível discriminar pacientes do grupo de controle dos pertencentes ao grupo de neoplasia.

Após aplicar o SPA, os números de onda selecionados, para serem aplicados no modelo CVA, foram: 1129,2; 1330,0; 1516,7; 1535,8; 1608,5; 1636,8 e 1702,5 cm^{-1} . O espectro médio, tanto do grupo controle, quanto de neoplasia, com os números de onda selecionados, é apresentado na Figura 20.

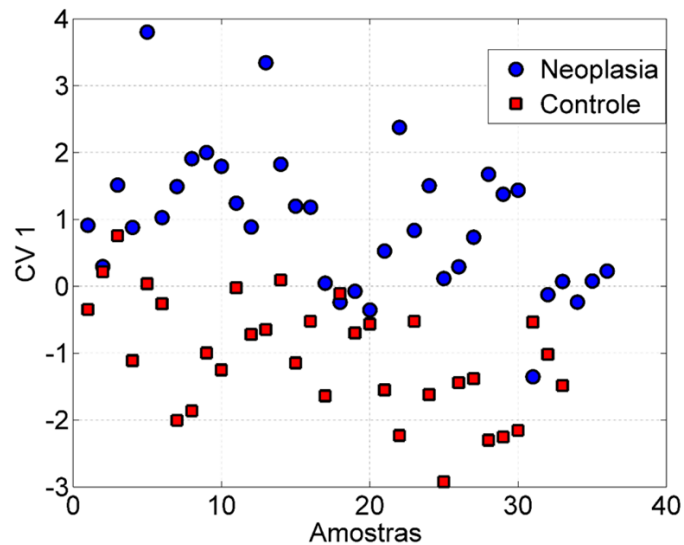
Figura 20: Espectro médio dos grupos controle e neoplasia com os números de onda selecionados (que serão utilizados no modelo CVA).



Fonte: autoria própria.

Os números de onda mais importantes, obtidos via SPA, foram combinados com a análise canônica de Fisher. Na Figura 21, é apresentado o resultado obtido pelo modelo. É possível observar uma boa discriminação entre os grupos controle e neoplasia, onde 84 % das amostras foram distinguidas corretamente pelo método empregado.

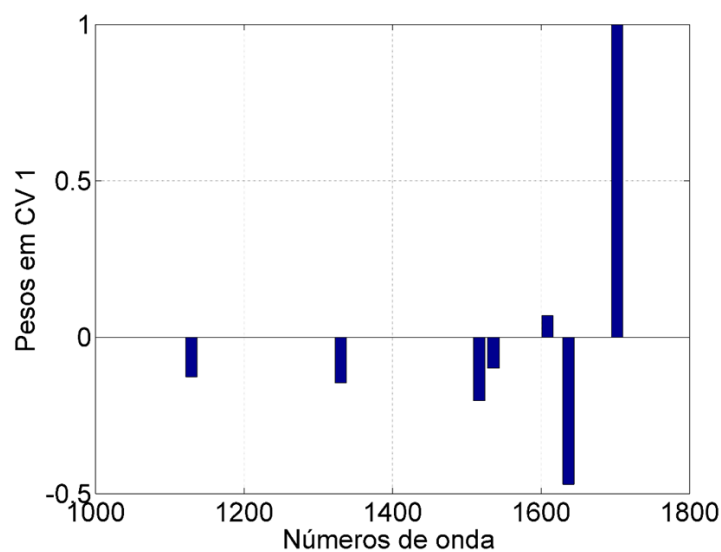
Figura 21: Projeção dos objetos na primeira variável canônica (CV1).



Fonte: autoria própria.

As variáveis canônicas indicam direções em que as diferenças entre os grupos são maximizadas em relação às variações dentro dos grupos (Ferreira, 2022). Variáveis que apresentam maiores valores de pesos indicam que o respectivo comprimento de onda teve significativa importância na tendência de separação entre os grupos. O gráfico de pesos dos números de onda selecionados é exibido na Figura 22.

Figura 22: Gráfico de pesos dos números de onda selecionados utilizados na análise canônica de Fisher.



Fonte: autoria própria.

Observa-se que os comprimentos de onda 1636,8 e 1702,5 cm^{-1} são os mais importantes para a primeira variável canônica. Estes modos vibracionais estão relacionados a estiramentos de grupos amida sendo uma combinação dos estiramentos $\nu\text{C=O}$, νCNH e νCN , que compõem este grupo. Este resultado sugere que o modelo foi capaz de identificar a presença de características proteicas que diferem entre os grupos analisados.

6 AVALIAÇÃO DO IMPACTO ECONÔMICO

A detecção precoce e precisa de doenças permite uma intervenção eficaz. O câncer de endométrio é a neoplasia genital maligna mais comum em países desenvolvidos. A maioria dos casos de CE são diagnosticados no início da doença, o que resulta em uma alta taxa de sobrevivência. Entretanto, os métodos atuais de triagem possuem limitações, por exemplo, a ultrassonografia transvaginal tem baixa concordância intra e interobservadores. A biópsia de endométrio às cegas apresenta baixa sensibilidade e especificidade, a histeroscopia, que apresenta maior exatidão diagnóstica, é um procedimento invasivo, caro sendo restrito a poucos hospitais.

Diante das delimitações das técnicas atuais de diagnóstico, surge a necessidade de métodos menos invasivos, mais rápidos e com melhor precisão para detectar biomarcadores cancerígenos. A espectroscopia Raman é capaz de fornecer informações moleculares em tempo real com um custo inferior ao de outras técnicas, como ultrassom e ressonância magnética. Dessa forma, a espectroscopia Raman pode ser utilizada como uma ferramenta de análise de materiais biológicos com aplicação na caracterização de células cancerígenas. Segundo Depciuh *et al.*, ainda existem poucos estudos publicados que analisam tecidos endometriais patológicos a partir da espectroscopia Raman.

Os resultados obtidos nesse trabalho, demonstram a eficácia da espectroscopia Raman, aliada a métodos quimiométricos, como uma técnica óptica não invasiva. Os mesmos podem proporcionar perspectivas de uma futura aplicação de diagnóstico clínico.

7 IMPACTO DA PROPOSTA NA CADEIA TECNOLÓGICA

Este Projeto Tecnológico possui baixo impacto na produtividade, visto que não é voltado para processos industriais. Entretanto, a espectroscopia Raman tem

potencial para caracterizar amostras biológicas, portanto, pode ser aplicada em ambiente clínico e hospitalar.

Um ponto a ser destacado em estudos espectroquímicos, é a relação custo-eficácia dos substratos utilizados para apoiar a amostra (Paraskevaidi *et al.*, 2018). Os substratos plasmônicos para espectroscopia Raman intensificada por superfície, sintetizados nesse trabalho, foram eficazes em intensificar o sinal Raman. A síntese de nanopartículas de prata requereu pouca quantidade de reagentes, assim como baixa geração de resíduos.

Diante do que foi exposto, o impacto tecnológico e científico é mais relevante, uma vez que a espectroscopia Raman intensificada por superfície pode ser utilizada como ferramenta de rastreamento de câncer de endométrio em pacientes com suspeita da doença. O emprego desta técnica, em análises clínicas, pode permitir que um número grande de pacientes seja avaliado diariamente, diminuindo a fila de espera de exames ginecológicos, como a histeroscopia, por exemplo.

8 CONCLUSÃO

Câncer de endométrio é o sexto tipo de câncer mais comum em pessoas com útero. O diagnóstico precoce resulta em um prognóstico favorável da maioria dos casos, com uma taxa de sobrevivência de 80 %. Entretanto, exames como histeroscopia, biópsia endometrial e curetagem são invasivos e caros. Diante disso, surge a necessidade de desenvolver métodos menos invasivos, mais baratos e rápidos. A Espectroscopia Raman está sendo utilizada em estudos biológicos e é considerada uma nova ferramenta para rápidos diagnósticos.

As AgNPs sintetizadas apresentaram formato esférico com tamanhos 30 ± 5 nm. Os substratos sintetizados a partir das mesmas se mostraram eficientes quanto a intensificação do sinal Raman para concentrações, da molécula sonda (AM), de até 10^{-8} mol/L.

Tendo em vista a eficiência dos substratos sintetizados como substrato SERS ativo, foi possível utilizá-los como plataforma para identificação de câncer de endométrio. Aliando as informações dos espectros SERS com cálculos quimiométricos foi constatado que os comprimentos de onda mais importantes para diferenciação dos grupos foram $1636,8$ e $1702,5$ cm^{-1} , característicos de estiramentos do grupo amida I. A análise canônica de Fisher forneceu uma boa discriminação entre

os grupos controle e neoplasia, onde 84 % das amostras foram distinguidas corretamente pelo método.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram a eficiência de substratos nanoestruturados na intensificação dos sinais Raman. Além disso, a espectroscopia SERS, em conjunto com métodos quimiométricos, demonstrou potencial para caracterizar amostras biológicas, portanto, pode ser aplicada em análises clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 1, p. 97– 106, 2010. <https://doi.org/10.1002/wics.51>

AMANT F, MOERMAN P, NEVEN P, TIMMERMAN D, VAN LIMBERGEN E, VERGOTE I. Endometrial cancer. **The Lancet**. 2005 Aug 6-12;366(9484):491-505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67063-8)

AMANT F, MIRZA MR, KOSKAS M, CREUTZBERG CL. Cancer of the corpus uteri. **Int J Gynaecol Obstet**. 2018 Oct;143 Suppl 2:37-50. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12612>

CANCER FACTS & FIGURES 2023. Atlanta: American Cancer Society; 2023. **American Cancer Society**. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2023/2023-cancer-facts-and-figures.pdf>

ANJOS, V. P. dos. **Espectroscopia Raman/SERS aplicada ao monitoramento de antibióticos**. 2023. 122 f. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/31603>

AOKI, P. H. B. **Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via SERS e espectroscopia de impedância**. 2011. 167f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Presidente Prudente, 2011. <http://hdl.handle.net/11449/99692>

ARAÚJO, A. P. **Medidas de espalhamento Raman em cristais de L-alanina a baixas temperaturas**. 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Física) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/31439>

BAKER, M. J. *et al*. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. **Chem. Soc. Rev.** 45, 1803–1818 (2016). DOI <https://doi.org/10.1039/C5CS00585J>

BARAKAT RR. Contemporary issues in the management of endometrial cancer. **CA Cancer J Clin**. 1998 Sep-Oct;48(5):299-314. PMID: 9742896. <https://doi.org/10.3322/canjclin.48.5.299>

BARANSKA, M. **Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine**. [s.l.] Springer International Publishing, 2014. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=UBTHBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=BARANSKA,+M.+Optical+Spectroscopy+and+Computational+Methods+in+Biology+and+Medicine.+%5Bs.l.%5D+Sp>

[ringer+International+Publishing,+2014.&ots=GiJdR0ELRK&sig=G9ELMvt5DnpR9N1Ah-IWCfQvYt0#v=onepage&q&f=false](#)

BARRA, A. de A. *et al.* Avaliação endometrial em pacientes usuárias de tamoxifeno. **Femina**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 5-8, jan./fev. 2013. <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/5820>

BITENCOURT, L. M. P. **Câncer de endométrio: mortalidade populacional e sobrevida de uma coorte hospitalar no Rio de Janeiro, Brasil.** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/23407>

BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol**, New York, v. 15, n.1, p. 10–17, 1983. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7)

BUKOWSKA, J., PIOTROWSKI, P. (2014). Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) in Bioscience: A Review of Application. In: Baranska, M. (eds) **Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine**. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics, vol 14. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7832-0_3.

CARTAXO, S. B. **Espectroscopia FT-Raman na Diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado.** 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008. <http://repositorio.unifesp.br/handle/11600/23926>

CLARKE, MEGAN A.; LONG, BEVERLY J.; DEL MAR MORILLO, ARENA; ARBYN, MARC; BAKKUM-GAMEZ, JAMIE N.; WENTZENSEN, NICOLAS. Association of Endometrial Cancer Risk With Postmenopausal Bleeding in Women: A Systematic Review and Meta-analysis. **Obstetrical & Gynecological Survey** 73(12):p 687-688, December 2018. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.2820>

CONDE J, DIAS JT, GRAZÚ V, MOROS M, BAPTISTA PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Front Chem**. 2014 Jul 15;2:48. PMID: 25077142; PMCID: PMC4097105. <https://doi.org/10.3389%2Ffchem.2014.00048>

DAVID MABWA, KETANKUMAR GAJJAR, DAVID FURNISS, ROBERTA SCHIEMER, RICHARD CRANE, CHRISTOPHER FALLAIZE, PIERRE L. MARTIN-HIRSCH, FRANCIS L. M., THEODORE KYPRAIOS, ANGELA B. SEDDON and SENDY PHANG. Mid-infrared spectral classification of endometrial cancer compared to benign controls in serum or plasma samples. **Analyst**, 2021, 146, 5631. DOI <https://doi.org/10.1039/D1AN00833A>

DEPCIUCH, J. *et al.* Spectroscopic evaluation of carcinogenesis in endometrial cancer. *Sci Rep* 11, 9079 (2021). <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-021-88640-7>

DINIZ, P. H. G. D. **Novas estratégias para classificação simultânea do tipo e**

origem geográfica de chás. 2013. 148f Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/7145>

DOMINGOS, M. C. **Estudo do efeito SERS utilizando nanopartículas de ouro e prata com diferentes morfologias.** 2020. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020. <https://app.uff.br/riuff/handle/1/21730>

FERLAY J., COLOMBET M., SOERJOMATARAM I, *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer.* 2021; 149: 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

FERREIRA, M. M. C.; **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**, Ed. UNICAMP: Campinas, 2015. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>

FERREIRA, M. M. C.. (2022). Quimiometria III - Revisitando a análise exploratória dos dados multivariados. **Química Nova**, 45(10), 1251–1264.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170910>

FREITAG, I., LIRA, M., ORTH, L., & HUBIE, APS (2023). Prevalência de câncer de endométrio em mulheres entre 45 e 79 anos com histórico de tabagismo e etilismo no município de Cascavel/PR. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, 6 (2), 7179–7197. <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n2-217>

GOMES, M. L. M. **«Nanotags» com efeito SERS baseados em nanopartículas magnéticas de ferrite de cálcio decoradas com nanopartículas de ouro ou prata.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Minho.
<https://hdl.handle.net/1822/55924>

SANTOS, D. A. S. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de metais nobres pelo método de agregação gasosa.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física. Depto. De Física dos Materiais e Mecânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. <https://doi.org/10.11606/D.43.2018.tde-22102018-031310>

HAACK, MICHELI. de SOUZA. **Identificação e caracterização de materiais por espectroscopia Raman.** 2015. Trabalho de conclusão de graduação – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
<http://hdl.handle.net/10183/132125>

HOBEIKA JD, ZEFERINO LC, PINTO-NETO AM. **Avaliação endometrial em mulheres na pós-menopausa e em usuárias de terapia de reposição hormonal.** *Rev. Ciênc Méd* 2000; 9: (1): 12-15. <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/1336>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2022.

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>

ISRAELSEN ND, HANSON C, VARGIS E. Nanoparticle properties and synthesis effects on surface-enhanced Raman scattering enhancement factor: an introduction. **Scientific World Journal**. 2015;2015:124582. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25884017; PMCID: PMC4390178. <https://doi.org/10.1155/2015/124582>

KILLACKEY MA, HAKES TB, PIERCE VK. Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens. **Cancer Treat Rep** 1985;69:237-8.

LEE, P.C.; MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced of Dyes on Silver and Gold Sols. **Journal of Physical Chemistry**, v.86, p.3391-3395, 1982.

<https://doi.org/10.1021/j100214a025>

LI Z, DEEN MJ, KUMAR S, SELVAGANAPATHY PR. Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring--instrumentation and potential. **Sensors (Basel)**. 2014 Sep 16;14(9):17275-303. PMID: 25230309; PMCID: PMC4208224.

<https://doi.org/10.3390/s140917275>

LOBO, A. O., MARTIN, A. A. e MARTINHO, H. Utilização da espectroscopia Raman para a caracterização de amostras biológicas. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba. 2005.

https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2005/inic/IC3%20anais/IC3-24.pdf

LOFFER FD. The Time Has Come to Quit Relying on a Blind Endometrial Biopsy or Dilation and Curettage to Rule Out Malignant Endometrial Changes. **J Minim Invasive Gynecol**. 2019 Nov-Dec;26(7):1207-1208. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30980989. <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2019.04.011>

LORRAINE MULFINGER, SALLY D. SOLOMON, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan A. Rutkowsky, and Charles Boritz. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education** 2007 84 (2), 322.

<https://doi.org/10.1021/ed084p322>

MEJÍA-SALAZAR JR, CAMACHO SA, CONSTANTINO CJL, OLIVEIRA ON. New trends in plasmonic (bio)sensing. **An Acad Bras Cienc**. 2018;90(1 Suppl 1):779-801. PMID: 29742207. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170571>

MITSUTAKE, H.; POPPI, R.; BREITKREITZ, M. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. [S. L.], v. 30, n. 11, p. 2243-2258, nov. 2019.

<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190116>

MOTA, A. P. **Um novo olhar sobre composição corporal em mulheres com câncer ginecológico – exploração de possíveis fenótipos**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência Multiprofissional em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2018.

<https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/9665>

OLIVEIRA, KAROLYNE VILELA de. **Desenvolvimento de substrato para uso com efeito Raman intensificado por superfície (SERS – Surface-Enhanced Raman Scattering) e aplicações para compostos modelo**. 2015. xvii, 90 f., il. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

<http://repositorio2.unb.br/jspui/handle/10482/20361>

OLIVEIRA, M.M.P. **Efeito da metformina sobre o receptor de estrogênio e ciclo celular de células de câncer de endométrio**. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia - Universidade de Brasília, Brasília, p. 14, 2021.

<https://bdm.unb.br/handle/10483/33762>

Paraskevaidi M, Morais CLM, Raglan O, Lima KMG, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PL, Kyrgiou M, Martin FL. Aluminium foil as an alternative substrate for the spectroscopic interrogation of endometrial cancer. **J Biophotonics**. 2018

Jul;11(7):e201700372. doi: 10.1002/jbio.201700372. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29512302. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700372>

PEIXOTO, LINUS PAULING F.; SANTOS, JACQUELINE FL; ANDRADE, GUSTAVO FS. BIOSSENSORES PLASMÔNICOS BASEADOS EM ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO.

Química Nova, v. 42, p. 1044-1049, 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170416>

PEREIRA, ANDERSON de JESUS. **Substratos vítreos com nanoestruturas metálicas para aplicações SERS**. 2016. 105 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9872>

PLATZ CE, BENDA JA. Female genital tract cancer. **Cancer** 1995;75:Suppl:270-294.

PROTA, F. E. **Avaliação da cavidade uterina através da histeroscopia e biópsia endometrial**. 2001. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) – Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

<https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2001.209461>

REIS A.F.F. Processo Diagnóstico. In: Oliveira HC, Lemgruber I, editores. **Tratado de Ginecologia**. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 115-117.

RIOS, CARLOS ALBERTO. **Estudos de manchas de sangue [manuscrito]: uma abordagem forense empregando espectroscopia Raman, imagens digitais e ferramentas quimiométricas**. 2018. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. <http://hdl.handle.net/1843/SFSA-B4LSH4>

ROSE PG. Endometrial carcinoma. **N Engl J Med.** 1996 Aug 29;335(9):640-9. Erratum in: N Engl J Med 1997 May 1;336(18):1335. PMID: 8692240. <https://doi.org/10.1056/nejm199608293350907>

SANTOS, BRENO HENRIQUE DANTAS dos. **Avaliação de equipamentos NIR e raman portáteis e técnicas de aprendizagem de máquina para estimar o tempo de deposição de sangue em pisos para fins forenses.** 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/38769>

SEBBEN, J. A. **Aplicação de espectroscopia Raman no monitoramento dos carotenoides em alimentos processados.** 2021. 115 f. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2021. <http://hdl.handle.net/10183/237484>

SILVA, C. L. D. **Consumo de alimentos ultraprocessados por mulheres com câncer de endométrio.** 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Clínica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2019. <https://www.ppgnc.injc.ufrj.br/wp-content/uploads/2020/12/DISSERTA%C3%87%C3%83O-MP-Caroline-Laranjeira-da-Silva.pdf>

SILVEIRA, R. A. **Avaliação da concordância da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 entre a amostra endometrial pré-operatória e a peça uterina nos carcinomas de endométrio.** 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2017. <http://hdl.handle.net/10183/179704>

SOARES S.F.C., GOMES A.A., ARAUJO M.C.U., GALVÃO FILHO A.R., GALVÃO R.K.H. The Successive projections algorithm TRAC Trends **Anal. Chem.**, 42 (2013), pp. 84-98, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.006>

SOUZA, KLESTER dos SANTOS. **Junções moleculares e agregados de nanobastões de ouro: um estudo SERS.** 2015. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-06042016-141254/publico/TeseCorrigidaKlesterSantosSouza.pdf>

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.** 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

THALER, JULIANA. **Espectroscopia Raman amplificada por superfície com nanopartículas de Ni, Co e Bi para a detecção de biomoléculas e microrganismos.** 2020. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2020. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/5122>