



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Diagnóstico de lesão renal aguda através da análise optoelectrónica de urina

Ana Filipa Basílio Moreno
(Licenciada em Biotecnologia)

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Alessandro Fantoni

Doutora Karina Soto

Júri:

Presidente: Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado

Vogais:

Doutora Luísa Teixeira Santos

Doutor Alessandro Fantoni

dezembro 2024



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Diagnóstico de lesão renal aguda através da análise optoelectrónica de urina

Ana Filipa Basílio Moreno
(Licenciada em Biotecnologia)

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Alessandro Fantoni (ISEL)

Doutora Karina Soto (ULSA)

Júri:

Presidente: Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)

Vogais:

Doutora Luísa Teixeira Santos (NOVA Medical School)

Doutor Alessandro Fantoni (ISEL)

dezembro de 2024

Agradecimentos

No decorrer deste trabalho de investigação foram várias as pessoas que contribuíram de alguma forma com o seu conhecimento, experiência e colaboração para a realização deste relatório, e às quais eu gostaria de deixar umas palavras de apreço.

Primeiramente, quero agradecer à Dra. Karina pela oportunidade de a ter como orientadora e por todo o conhecimento que através de si obtive. Manifesto o meu profundo agradecimento ao professor Alessandro Fantoni pelo acompanhamento, apoio, e incentivo em todo o processo, que foram essenciais para a minha adaptação e crescimento profissional e pessoal.

Não poderia deixar de agradecer à Dra. Sofia Pereira e à Dra. Elsa Soares por toda a ajuda que me deram.

Estou também grata a todos os professores que contribuíram para a minha formação, aos colegas que me acompanharam ao longo destes dois anos. Agradeço, também, a todos os meus amigos e família que sempre me apoiaram, estimularam e motivaram, sem eles nada disto seria possível.

A todos vocês, o meu muito obrigada.

Declaração de integridade

Declaro que este Trabalho de Mestrado é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor,

Lisboa, 21 de dezembro de 2024

Resumo

A Lesão Renal Aguda (LRA) é uma condição grave com elevado risco de progressão para Doença Renal Crónica (DRC), especialmente quando não detetada precocemente. Este trabalho investiga o uso de técnicas optoelectrónicas, nomeadamente a espectroscopia de fluorescência e Raman, como métodos inovadores e não invasivos para a identificação de biomarcadores em amostras de urina. A espectroscopia de fluorescência demonstrou-se altamente eficaz na deteção de padrões espectrais relacionados com biomarcadores como a creatinina, permitindo diferenciar claramente amostras de indivíduos saudáveis e de pacientes com DRC. Esta abordagem, ao fornecer informações detalhadas sobre a concentração e presença de biomarcadores na urina, tem o potencial de revolucionar o diagnóstico precoce de doenças renais, permitindo intervenções terapêuticas mais rápidas e precisas. Com base nos resultados obtidos, as técnicas optoelectrónicas mostram grande viabilidade para futuras aplicações clínicas no diagnóstico de LRA e DRC.

Palavras-chave: Lesão Renal Aguda, Doença Renal Crónica, Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia Raman, Biomarcadores, Diagnóstico Não Invasivo.

Abstract

Acute Kidney Injury (AKI) poses a significant risk of progressing to Chronic Kidney Disease (CKD), especially when early detection is delayed. This study explores the use of optoelectronic techniques, particularly fluorescence and Raman spectroscopy, as innovative and non-invasive methods for identifying biomarkers in urine samples. Fluorescence spectroscopy proved highly effective in detecting spectral patterns associated with key biomarkers such as creatinine, enabling clear differentiation between healthy individuals and patients with CKD. By providing detailed insights into the concentration and presence of biomarkers in urine, this approach has the potential to revolutionize early renal disease diagnostics, allowing for faster and more precise therapeutic interventions. Based on the results, optoelectronic techniques demonstrate strong viability for future clinical applications in the diagnosis of AKI and CKD.

Keywords: Acute Kidney Injury, Chronic Kidney Disease, Fluorescence Spectroscopy, Raman Spectroscopy, Biomarkers, Non-Invasive Diagnosis.

Índice

Agradecimentos	i
Declaração de integridade.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas	xii
Abreviaturas.....	xiii
Capítulo 1 . Introdução	1
1.1. Motivação	2
1.2. Objetivos.....	3
1.3. Organização da tese.....	4
1.4. Contribuições da tese de mestrado.....	5
Capítulo 2 . Biomarcadores	6
2.1. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL).....	8
2.2. Cistatina C (Cys C).....	9
2.3. Molécula-1 de lesão renal aguda (Kim-1).....	9
2.4. Interleucina-18 (IL-18).....	10
Capítulo 3 . Fundamentos teóricos.....	11
3.1. Espectroscopia de Fluorescência	11
3.2. Espectroscopia Raman.....	13
Capítulo 4 . Metodologia.....	16
4.1. Caracterização das amostras.....	16
4.1.1. Amostra de urina.....	16
4.1.2. Amostras Padrão	16
4.2. Instrumentação.....	17
4.2.1. Espectroscópio de fluorescência.....	17
4.2.2. Espectro Raman	18

4.3.	Calibração.....	19
4.4.	Preparação da amostra.....	20
4.5.	Procedimento de análise de amostras	21
4.6.	Parâmetros de aquisição	21
4.6.1.	Espectroscópio de fluorescência	21
4.6.2.	Espectroscópio Raman	22
4.7.	Processamento de dados	22
Capítulo 5 .	Análise e Discussão dos Resultados	24
5.1.	Amostras padrão de creatinina	24
5.2.	Amostras de urina.....	27
5.2.1.	Amostras P	27
5.2.3.	Amostras de voluntários com LRA	31
5.2.4.	Comparação das amostras P com as amostras A	33
5.2.5.	Limitações ao estudo	35
Capítulo 6 .	Conclusões	36
Capítulo 7 .	Bibliografia	39
Capítulo 8 .	Anexos	43

Índice de figuras

Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).	11
Figura 3.2 - Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro (Lakowicz, 2006).....	12
Figura 4.1 - Espectrofluorímetro Jasco FP-8300 Series (imagem original).	18
Figura 4.2 - Espectrómetro Raman usado na montagem do projeto LUMINA (Fantoni et al., 2024).	19
Figura 4.3 - Espectro 3D de uma amostra de água destilada (imagem original).	19
Figura 4.4 - Espectro Raman de uma amostra de água destilada (imagem original).	20
Figura 4.5 - Espectro Raman obtidos da mesma amostra com diferentes calibrações (imagem original).....	23
Figura 5.1 - Espectro Raman de 5 amostras padrão de creatinina com diferentes concentrações (1,25;2,5;5;7,5 e 10 mg/dL) (imagem original).	24
Figura 5.2 - Espectro Raman de uma amostra padrão de creatinina com uma concentração de 100 mg/dL (imagem original).	25
Figura 5.3 - Espectros de fluorescência de 5 amostras padrão de creatinina com diferentes concentrações (a-1,25 mg/dL; b-2,5 mg/dL; c-5 mg/dL; d-7,5 mg/dL e e-10 mg/dL) (imagem original).....	26
Figura 5.4- Espectro Raman das amostras de doadores saudáveis (imagem original).....	28
Figura 5.5 - Espectros de fluorescência das amostras de doadores saudáveis (imagem original).....	28
Figura 5.6 - Espectro Raman das amostras A1 à A4 (imagem original).	29
Figura 5.7 - Espectros fluorescência das amostras A1 à A4 (imagem original).	29
Figura 5.8 -Espectros fluorescência das amostras A5 e A6 (imagem original).	30
Figura 5.9 - Espectro Raman das amostras A5 e A6 (imagem original).	31
Figura 5.10 - Espectro Raman das amostras A7 e A8 (imagem original).	32
Figura 5.11 - Espectros fluorescência das amostras A7 e A8 (imagem original).	32
Figura 5.12 - Espectro Raman de amostras de doadores com DCR, amostra A1, e doadores saudáveis, amostra P1(imagem original).	33
Figura 5.13 - Espectros fluorescência de amostras de doadores com DCR, amostra A1, e doadores saudáveis, amostra P1(imagem original).	34
Figura 5.14 - Localização dos picos de fluorescência de compostos químicos (Khan et al., 2022).	34

Índice de tabelas

Tabela 4.1 - Caracterização das amostras de creatinina.	16
Tabela 5.1 - Codificação das amostras analisadas.	27

Abreviaturas

AKI	Acute Kidney Injury
Cys C	Cistatina C
CKD	Chronic Kidney Disease
DRC	Doença renal crónica
FISH	Fluorescência in situ
IL-18	Interleucina-18
IR	Infravermelho
IRA	Insuficiência renal aguda
kDa	kiloDaltons
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
Kim-1	Molécula-1 de lesão renal aguda
LRA	Lesão renal aguda
LUMINA	Light Based Urine Monitoring and Analysis
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
NIR	Comprimentos de onda na faixa do infravermelho próximo
nm	Nanometros
SCr	Creatinina sérica
SERS	Espectroscopia Raman amplificada por superfície
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TP	Tubulo proximal

Capítulo 1 . Introdução

A Lesão Renal Aguda (LRA) é uma condição caracterizada por uma perda abrupta e geralmente reversível da função renal, com um aumento significativo dos riscos de mortalidade e de progressão para doença renal crônica (DRC). No entanto, os métodos de diagnóstico atuais, baseados principalmente na medição da creatinina sérica (SCr), são insuficientes para uma detecção precoce e eficiente da LRA, uma vez que os níveis de SCr podem permanecer normais nas fases iniciais da lesão. Essa limitação pode atrasar o tratamento, aumentando a probabilidade de complicações, como progressão para insuficiência renal crônica ou necessidade de diálise. Conseqüentemente, é fundamental desenvolver métodos de diagnóstico mais sensíveis, capazes de identificar precocemente os biomarcadores indicativos da LRA, reduzindo os impactos clínicos e sociais desta condição (Bellomo et al., 2012).

A LRA afeta principalmente pacientes hospitalizados, sobretudo em unidades de cuidados intensivos, com uma prevalência que pode atingir 30%. Apesar da sua elevada incidência e dos avanços na medicina, a dificuldade de detecção precoce resulta na perda de oportunidades para uma intervenção terapêutica mais eficaz, colocando em risco a vida dos pacientes (Bellomo et al., 2004).

O presente estudo propõe o uso de técnicas optoeletrônicas, como a espectroscopia de fluorescência e a espectroscopia Raman, para a detecção não invasiva de biomarcadores associados à LRA. Essas técnicas são capazes de analisar amostras de urina e identificar variações espectrais que correspondem à presença de biomarcadores específicos, como a creatinina e no futuro a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) (Bellomo et al., 2012; Fantoni et al., 2024).

A espectroscopia de fluorescência permite monitorizar a emissão de luz em diferentes comprimentos de onda, proporcionando informações detalhadas sobre a concentração de biomarcadores fluorescentes na urina. Por outro lado, a espectroscopia Raman oferece uma "impressão digital" molecular, permitindo a identificação precisa da composição química das amostras. Ambas as técnicas, quando aplicadas de forma combinada, podem aumentar a sensibilidade e a especificidade na detecção de LRA, ao identificar variações mínimas nas amostras de urina que seriam impossíveis de captar por métodos tradicionais (Lakowicz, 2006; Vandenabeele, 2013).

Essas técnicas, além de serem não invasivas, também são economicamente viáveis para a implementação em ambiente clínico, podendo revolucionar o diagnóstico precoce da LRA e DRC e, por conseguinte, melhorar os desfechos clínicos. Com base em resultados preliminares, é possível observar diferenças significativas nos espectros de fluorescência e espectros Raman entre amostras de urina de indivíduos saudáveis e de pacientes com LRA ou DRC, indicando o potencial dessas ferramentas na prática médica (Fantoni et al., 2024).

O desenvolvimento desta abordagem inovadora permite facilitar a implementação de métodos de diagnóstico mais rápidos e precisos, assegurando que os profissionais de saúde possam intervir mais cedo, reduzindo o risco de complicações graves associadas à LRA. O impacto desta tecnologia poderá ser vasto, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo custos hospitalares e contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas de saúde (Bellomo et al., 2012; Fantoni et al., 2024).

1.1. Motivação

A LRA é uma doença que comporta riscos graves para a saúde do paciente, incluindo insuficiência renal crônica e morte. Por isso, é vital diagnosticá-la o mais cedo para minimizar os riscos associados a complicações renais. A maior parte dos métodos de diagnóstico atuais são invasivos ou inadequados, dado que estes podem não ser suficientemente sensíveis ou específicos para descobrir a LRA desde o início.

É por isso que encontrar métodos de diagnóstico alternativos e menos invasivos é pertinente. A espectroscopia de fluorescência e a espectroscopia Raman são a solução correspondente. Estas técnicas optoelectrónicas exploram as características moleculares de substâncias examinadas na urina e ajudam a identificar os biomarcadores correspondentes à LRA e DCR. Este trabalho destina-se ao estudo do potencial da aplicação de espectroscopia por fluorescência e Raman na análise de urina de doadores voluntários. Para tal pretende-se comparar espectros a fim de descobrir as variações espectrais entre a urina de doadores voluntários saudáveis e diagnosticados com LRA ou DCR. O futuro desenvolvimento da hipótese pode revolucionar a abordagem utilizada para detetar a LRA, facilitando o diagnóstico e, como resultado, aperfeiçoando os parâmetros dos resultados clínicos e vida diária dos pacientes. Esse trabalho apoia a iniciativa mais ampla de desenvolvimento e implementação de métodos de diagnóstico inovadores.

1.2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho centram-se na exploração e validação de métodos optoelectrónicos de análise para a deteção precoce de biomarcadores associados a doenças renais, como a LRA e a doença renal crónica DRC. A necessidade de técnicas não invasivas e mais sensíveis para diagnóstico motivou a aplicação da espectroscopia de fluorescência e Raman como ferramentas principais para a análise de amostras de urina. Através destas técnicas, pretende-se obter uma correlação fiável entre os padrões espectroscópicos e a presença de biomarcadores clínicos relevantes, contribuindo assim para a melhoria do diagnóstico e monitorização de patologias renais.

Deste modo, os principais objetivos desta investigação são:

1. Confirmar laboratorialmente a correlação das propriedades espectroscópicas óticas da urina humana para a deteção de biomarcadores específicos ou padrões característicos causados pela presença de múltiplos biomarcadores.
2. Validar a deteção de biomarcadores comuns como a creatinina sérica (SCr) e a cistatina C (Cys C), e no futuro a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), através da análise espectroscópica.
3. Realizar análises de urina utilizando técnicas de espectroscopia de fluorescência e Raman para identificar os padrões de biomarcadores.
4. Comparar os resultados obtidos com dados clínicos, proporcionando conclusões valiosas sobre a incidência dos biomarcadores e a sua relação com a presença de doenças como LRA e DRC.
5. Desenvolver uma abordagem inovadora para o diagnóstico não invasivo de doenças renais, aplicando técnicas optoelectrónicas para facilitar a identificação precoce de biomarcadores.
6. Avaliar a precisão das técnicas de espectroscopia de fluorescência e Raman na análise de amostras biológicas e seu potencial na prática clínica.

Este conjunto de objetivos orienta a investigação para fornecer soluções tecnológicas e científicas que permitam melhorar a precisão no diagnóstico das doenças renais, abrindo novas possibilidades para a prática clínica.

1.3. Organização da tese

O presente documento está organizado em 5 capítulos, os quais descrevem toda a evolução do projeto, desde os fundamentos teóricos até à parte prática referente à análise de amostras e respetivos resultados.

O capítulo 1 oferece uma breve introdução ao projeto, explicando os objetivos e metodologias do trabalho realizado.

Nos capítulos 2 e 3 é apresentado o estado da arte, onde se discute a literatura existente sobre o tema e se introduzem os conceitos chave para a compreensão deste estudo.

O capítulo 4, correspondente aos materiais e métodos, abrange toda a parte experimental do projeto em questão, desde o equipamento utilizado, passando pelo procedimento da técnica até à caracterização das amostras analisadas.

No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos através da análise dos espectros obtidos.

Finalmente, no capítulo 6 são elaboradas as conclusões finais do trabalho de investigação, respondendo aos objetivos propostos, e são apresentadas as perspetivas de melhorias futuras a serem realizadas neste âmbito.

1.4. Contribuições da tese de mestrado

O presente projeto de pesquisa faz parte de uma parceria entre o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) com o departamento de investigação em nefrologia do centro hospitalar de Setúbal.

Esta tese encontra-se envolvida no projeto LUMINA (*Light Based Urine Monitoring and Analysis*), financiada pelo programa IDI&CA 2023 do IPL, que resultou na publicação de um artigo com o título “*The LUMINA setup for a light-based urine monitoring and analysis*” (Fantoni et al., 2024).

O presente estudo provém da continuação de uma outra ideia, sendo esta a deteção de proteínas na urina através de um sensor portátil, vencedora do 1º prémio do concurso ACE 2023 e do 3º prémio do concurso H-INNOVA.

Com este desafio procura-se uma nova forma de aprendizagem e de contacto com novos equipamentos, como neste caso, o espectrofluorímetro e espectroscópio Raman. Além disso, pretende-se facilitar o diagnóstico de doenças do foro nefrológico.

Capítulo 2 . Biomarcadores

A quantificação, no plasma e/ou na urina, de moléculas endógenas de baixo peso molecular, que são livremente filtradas pelo endotélio capilar, pode ser utilizada clinicamente para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG). Níveis séricos elevados destes biomarcadores podem indicar (I) lesão renal constitucional ou adquirida, pela afetação glomerular ou tubular como ocorre na DRC, ou (II) perda abrupta da função renal que pode ser lesão intrínseca ou transitória da função tubular, que ocorre na LRA (S. R. Vaidya & Aeddula, 2024).

A DRC ocorre devido à perda progressiva da função renal. Esta é definida, como a presença de lesão renal ou uma taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) inferior a 60 ml/min/1,73 m², persistindo por 3 meses ou mais, independentemente da causa (“Chapter 1: Definition and Classification of CKD,” 2013) A lesão renal refere-se às anomalias patológicas em estudos de imagem ou biópsia renal, anomalias no sedimento urinário ou aumento das taxas de excreção urinária de albumina. A classificação KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) DCR de 2012 classifica a DRC em 6 categorias com base na TFG, mas também inclui o subestadiamento baseado em três níveis de albuminúria (Inker et al., 2014).

A queda da TFG está correlacionada com a gravidade da DRC, a albuminúria indica o grau do dano glomerular (Lousa et al., 2020; McMahon & Waikar, 2013; S. R. Vaidya & Aeddula, 2024).

A LRA, anteriormente chamada de insuficiência renal aguda (IRA), indica uma redução súbita e muitas vezes reversível da função renal, medida pela TFG (Bellomo et al., 2004; Farrar, 2018). No entanto, imediatamente após uma lesão renal, os níveis séricos de ureia ou creatinina (SCr) podem estar dentro da faixa normal, e o único sinal de LRA pode ser uma redução do volume urinário. Vários critérios têm sido utilizados para identificar LRA, o KDIGO é a ferramenta mais recentemente utilizada. De acordo com KDIGO, LRA é a presença de qualquer um dos seguintes (“Chapter 1: Definition and Classification of CKD,” 2013):

Aumento da SCr em 0,3 mg/dL ou mais em 48 horas;

Aumento da SCr para 1,5 vezes ou mais do que o valor basal dos 7 dias anteriores;

Volume de urina menor que 0,5 mL/kg/h por pelo menos 6 horas.

Além do impacto a curto prazo da LRA pela acumulação hídrica e de resíduos não filtrados, existe evidência sobre a associação entre a LRA e resultados adversos a longo prazo, como episódios recorrentes de LRA em 25-30% dos casos, readmissões hospitalares em até 40% dos doentes, um risco aumentado de eventos cardiovasculares e da progressão da DRC, bem como a LRA tem causado um aumento significativo da mortalidade a longo prazo (“Chapter 1: Definition and Classification of CKD,” 2013; Inker et al., 2014).

Embora a SCr seja amplamente reconhecida como um marcador impreciso e tardio de lesão renal, todos os critérios de definição de DRC e LRA baseiam-se neste biomarcador. Extensas pesquisas pré-clínicas e clínicas sobre biomarcadores de LRA e DRC abriram uma nova perspectiva neste campo. Foi afirmado que um diagnóstico mais oportuno usando novos biomarcadores permitiria uma intervenção mais precoce e poderia melhorar os resultados dos doentes.

Um biomarcador é um indicador mensurável de normalidade de processos biológicos ou patológicos e/ou expressão de resposta a alguma intervenção. Novos biomarcadores da LRA sem dúvida alcançaram um papel importante no diagnóstico e até mesmo no prognóstico, não apenas para LRA como para resultados associados, mas apenas em campos de pesquisa específicos. A questão de como utilizá-los de forma otimizada à beira do leito ainda não foi resolvida. Apesar do grande número e extensão de biomarcadores propostos na última década, as elevadas expectativas não foram seguidas por um resultado confiável para determinar uma mudança na prática clínica. Aparentemente, ainda não há motivos suficientes para abandonar a SCr, apesar das suas limitações (Bellomo et al., 2004).

O desempenho dos biomarcadores na LRA é influenciado por muitos fatores: amostra de população, tempo de medição após a lesão, limiar de diagnóstico de LRA entre outros. Todos estão estreitamente relacionados com a complexidade da patogênese e patobiologia da LRA. Isto foi demonstrado no desempenho de seis biomarcadores em doentes com LRA e com DRC pré-existente (“Chapter 1: Definition and Classification of CKD,” 2013).

Depois de mais de um século restrito aos primeiros biomarcadores para detecção de danos renais, foram aparecendo novas moléculas utilizadas como biomarcadores, muitas delas com repetidas validações para que possam ser adequadamente incorporadas à prática clínica (Strimbu & Tavel, 2010; Younes-Ibrahim & Younes-Ibrahim, 2022).

O desenvolvimento destes biomarcadores não está focado na identificação da etiologia da doença, mas na detecção de um fenómeno fisiopatológico renal, relacionado com a forma de como estes afetam a função de filtrado glomerular ou da função tubular.

2.1. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL)

A NGAL é uma proteína de 25 kiloDaltons (kDa) e é descrita pela primeira vez nos grânulos dos neutrófilos, mas também é sintetizada em vários tecidos, como no rim, no pulmão e no trato digestivo, após lesão epitelial (Schmidt-Ott et al., 2006; Yang et al., 2003). As moléculas circulantes são filtradas pelo glomérulo e reabsorvidas no túbulo proximal (TP). A produção fisiológica de NGAL aumenta com a idade e é maior em mulheres. Os principais locais de produção de NGAL no rim, são a alça ascendente de Henle e o ducto coletor (Schmidt-Ott et al., 2006; Yang et al., 2003).

Plasma NGAL foi identificado como um biomarcador preciso de LRA em doentes admitidos no serviço de urgência, tendo sido proposta uma classificação de três graus de LRA com base nos níveis de NGAL no plasma associados aos dados clínicos e biomarcadores adicionais para identificar com mais precisão a LRA (“Chapter 1: Definition and Classification of CKD,” 2013). As concentrações urinárias e plasmáticas de NGAL demonstraram identificar doentes com alto risco de LRA na prática clínica tendo sido sugerido um *cut-off* que requer validação (Bellomo et al., 2004).

Na LRA, a diminuição da reabsorção tubular promove a detecção urinária precoce de NGAL, que aumenta na urina e no plasma entre 3 horas e 5 dias após a lesão inicial. O aumento da expressão de NGAL também pode ocorrer devido a infeções bacterianas, síndrome da resposta inflamatória sistémica e doenças sistémicas crónicas e não infecciosas. Por conseguinte, a inflamação é um fator de confusão para a utilização de NGAL como biomarcador de LRA, especialmente em doentes críticos com sépsis (Schmidt-Ott et al., 2006; Yang et al., 2003).

2.2. Cistatina C (Cys C)

A Cys C é uma proteína inibidora da cisteína proteinase de 13 kDa e é sobre tudo um biomarcador de filtrado glomerular. A Cys C é sintetizada em todas as células nucleadas, os venterníveis séricos não dependem do peso nem da idade, sendo por isso vantajosa para uso clínico aquando comparada com a creatinina. No rim, a Cys C é livremente filtrada através da membrana glomerular, sendo imediatamente reabsorvida no TP, onde é catabolizada, não retornando à circulação, nem é detetada na urina. Os níveis séricos de Cys C são afetados pela função tireoideia (aumenta com o hipertireoidismo e diminui com o hipotireoidismo). Como os níveis séricos de Cys C e creatinina têm a mesma relação hiperbólica com a TFG, ambos os biomarcadores são utilizados nas equações de estimativa da TFG (Randers & Erlandsen, 1999; Van Deventer et al., 2011).

A CysC sérica é um excelente biomarcador precoce para o diagnóstico de LRA demonstrado em doentes de urgência, com capacidade para diferenciar de forma confiável a LRA da lesão pré-LRA, mas não da DRC (Bellomo et al., 2004).

2.3. Molécula-1 de lesão renal aguda (Kim-1)

A KIM-1 é uma glicoproteína transmembranar de 38,7 kDa, cuja produção é regulada pelo túbulo renal proximal. A deteção quantitativa de Kim-1 urinária aumenta linearmente com a idade, mesmo em indivíduos saudáveis, sendo os níveis mais elevados observados em homens (Ichimura et al., 1998, 2008). Os valores urinários e plasmáticos de Kim-1 mostram que este é um biomarcador precoce da proliferação e regeneração de células do TP com sensibilidade e especificidade significativas para LRA, tanto em estudos humanos como em testes experimentais (V. S. Vaidya et al., 2006, 2008). Além da LRA, este biomarcador é uma ferramenta útil para deteção e acompanhamento da progressão da DRC, orientando as intervenções terapêuticas em pacientes com risco de desenvolver DRC. Níveis elevados de Kim-1 estão relacionados com os estadios da DRC e estão alterados em casos de proteinúria e doença renal inflamatória (McWilliam et al., 2018; Sabbisetti et al., 2014; V. S. Vaidya et al., 2009).

2.4. Interleucina-18 (IL-18)

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória de 24 kDa, originalmente identificada como um fator pró-inflamatório indutor do interferão- γ (fator pró-inflamatório que regula a imunidade inata e adaptativa), sendo secretada por células do sistema imunitário e libertada no TP. O precursor inativo da IL-18 é sintetizado em vários órgãos, incluindo as células epiteliais do TP e dos ductos coletores renais (Hall et al., 2010; Krawczeski et al., 2011; Lin et al., 2015; Melnikov et al., 2001).

Os processos inflamatórios produzem caspase 1 que ativa a IL-18, que é eliminada na urina. A IL-18 urinária tem sido investigada como um biomarcador de LRA. Detetada 6 horas após a lesão isquêmica, pode atingir 25 vezes o valor normal em 12 horas e a IL-18 antecipa o diagnóstico de LRA, aquando comparada com a creatinina, em 24 a 48 horas (Hall et al., 2010; Krawczeski et al., 2011; Lin et al., 2015; Melnikov et al., 2001).

Capítulo 3 . Fundamentos teóricos

3.1. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica analítica preponderante e amplamente utilizada em várias áreas da ciência e tecnologia, incluindo bioquímica, química, biologia e medicina.

A espectroscopia de fluorescência baseia-se na capacidade que certas moléculas, chamadas fluoróforos ou fluorocromos, têm de absorver luz numa determinada faixa de comprimentos de onda e, subsequentemente, emitir luz em comprimentos de onda mais longos, ou seja, de menor energia (Lakowicz, 2006). Este processo envolve duas etapas principais: excitação e emissão. A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração da espécie emissora e pode ser usada na construção de modelos quantitativos.

Quando um fluoróforo absorve um fóton de luz de alta energia, este é promovido de um estado de energia fundamental (S_0) para um estado excitado (S_1) (Lakowicz, 2006). Após um curto período, normalmente na ordem dos nanossegundos, o fluoróforo retorna ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de luz de menor energia, correspondendo a um comprimento de onda superior ao da luz absorvida (Lakowicz, 2006). Este fenómeno é representado pelo diagrama de Jablonski (**Figura 3.1**), que ilustra as transições entre diferentes estados energéticos de uma molécula (Lakowicz, 2006).

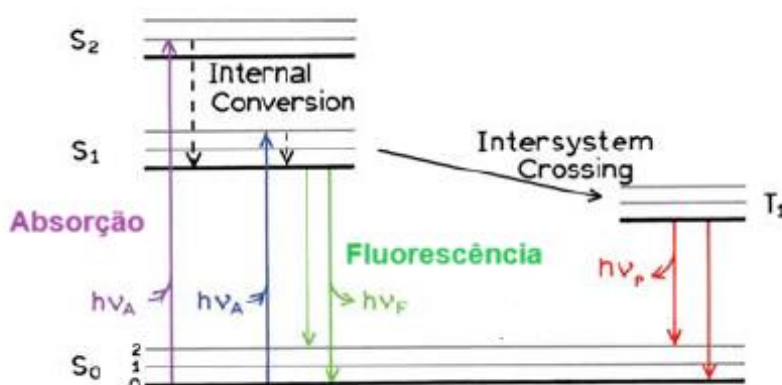


Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).

Os espectrofluorímetros são os instrumentos primários utilizados para realizar medições de fluorescência, este equipamento registra as intensidades do sinal de emissão de fluorescência, sob uma dada excitação numa faixa de comprimentos de onda pré-determinados pelo analista. Nesse instrumento, o comprimento de onda de excitação também pode variar à escolha do analista. (Jasco, n.d.).

Os espectrofluorímetros contém vários componentes-chave, incluindo a fonte de luz (geralmente uma lâmpada de xenônio ou LED), os monocromadores e os detetores (Jasco, n.d.). Os monocromadores são utilizados para selecionar comprimentos de onda específicos tanto para excitação como para emissão (Jasco, n.d.). Os detetores, tais como fotomultiplicadores ou detetores de estado sólido, são usados para medir a intensidade da luz emitida (Jasco, n.d.). A **Figura 3.2.** mostra um diagrama esquemático simplificado de um espectrofluorímetro.

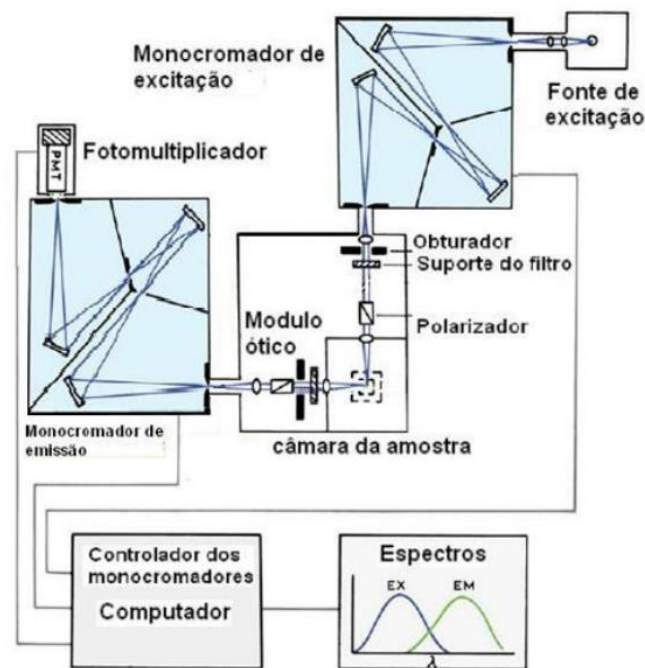


Figura 3.2 - Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro (Lakowicz, 2006).

A espectroscopia de fluorescência é extremamente versátil e tem várias aplicações práticas. Na análise de biomoléculas, permite o estudo da conformação, interações e as dinâmicas de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas (Lakowicz, 2006). No diagnóstico médico, é utilizada em técnicas de imagem, como a fluorescência in situ (FISH) para detetar anomalias genéticas (Lakowicz, 2006).

Entre as vantagens desta técnica, destacam-se a sua sensibilidade, que permite detetar a emissão luminosa contra um fundo escuro. Em geral, para garantir a linearidade da intensidade da emissão, com a concentração, é importante evitar o chamado “efeito filtro”, que é a supressão da luminescência observada, quando a radiação emitida pela substância em análise é absorvida por moléculas próximas, inclusive do próprio analito em altas concentrações. Por isso, é necessário verificar se a absorvância da amostra não é superior a 0,05 (Skoog et al., 2014).

No entanto, existem também desvantagens, como a fotodegradação, onde os fluoróforos podem degradar-se com a exposição prolongada à luz, afetando assim a precisão das medições, e a interferência da fluorescência, onde substâncias contaminantes ou autofluorescentes podem interferir nas medições (Lakowicz, 2006).

Em suma, a espectroscopia de fluorescência é uma técnica crucial na investigação científica moderna, pois permite um conhecimento detalhado sobre a estrutura e dinâmica de moléculas fluorescentes. O seu desenvolvimento e aplicação contínua são suportados por avanços tecnológicos na instrumentação e uma compreensão dos princípios teóricos subjacentes (Jasco, n.d.; Lakowicz, 2006).

3.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de análise não destrutiva, que se baseia na dispersão inelástica da luz para identificar e caracterizar a composição molecular de uma amostra. Esta técnica foi descoberta por Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 e tornou-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas científicas e industriais, devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura química e molecular dos materiais analisados (Vandenabeele, 2013).

O princípio fundamental da espectroscopia Raman envolve a interação entre a luz e as moléculas de uma amostra. Quando um feixe de luz monocromática, geralmente emitido por um laser que incide sobre a amostra, a maior parte da luz é espalhada de forma elástica, mantendo a energia da luz incidente, este processo é conhecido por espalhamento de Rayleigh (Vandenabeele, 2013).

Contudo, apenas uma pequena fração da luz é espalhada de forma inelástica, resultando assim numa alteração na energia dos fótons dispersos, sendo este fenómeno, denominado de efeito Raman que ocorre devido à interação da luz com as vibrações moleculares ou modos rotacionais da amostra (Vandenabeele, 2013).

As alterações de energia observadas nos fótons dispersos resultam num desvio da frequência de luz espalhada, que é característico das vibrações moleculares específicas da amostra. Este desvio de frequência, conhecido como deslocamento Raman, é altamente específico e pode ser utilizado para identificar as diferentes moléculas presentes na amostra. Consequentemente, a espectroscopia Raman oferece uma espécie de "impressão digital" molecular, permitindo a identificação precisa dos constituintes químicos da amostra (Vandenabeele, 2013).

A espectroscopia Raman possui várias vantagens que a tornam extremamente útil em diversas áreas. Uma das principais vantagens é a sua capacidade de analisar amostras no seu estado natural, sem necessidade de preparação complexa ou destrutiva. Esta característica é particularmente relevante em situações onde a integridade da amostra deve ser preservada, como na análise de material biológico ou compostos farmacêuticos (Vandenabeele, 2013).

Outra vantagem significativa da espectroscopia Raman é a sua alta especificidade molecular. Ao contrário de outras técnicas espectroscópicas, a espectroscopia Raman consegue distinguir, entre moléculas com estruturas químicas muito semelhantes, a molécula de interesse. Esta característica é crucial em análises complexas onde a presença de isómeros ou compostos com diferenças estruturais mínimas pode afetar os resultados. Além disso, a espectroscopia Raman é compatível com a análise de amostras em diferentes estados físicos, incluindo sólidos, líquidos e gases, podendo ser usada em condições de análise variadas (Vandenabeele, 2013).

Uma aplicação particularmente promissora da espectroscopia Raman encontra-se na área biomédica, especialmente na análise de fluidos corporais, como a urina. Neste contexto, a técnica oferece uma abordagem não invasiva e rápida para o diagnóstico e monitorização de várias condições de saúde.

No estudo "*The LUMINA setup for a light-based urine monitoring and analysis*", os autores exploram o uso da espectroscopia Raman para a monitorização e análise de urina, demonstrando como a técnica pode ser integrada em sistemas de diagnóstico baseados em luz. O projeto LUMINA utiliza a espectroscopia Raman para identificar e quantificar diferentes componentes químicos na urina, sem a necessidade de reagentes adicionais ou preparação complexa da amostra, o que é essencial em aplicações clínicas onde a rapidez e a precisão são essenciais (Fantoni et al., 2024).

Apesar das suas numerosas vantagens, a espectroscopia Raman enfrenta alguns desafios técnicos. Um dos principais desafios é a baixa intensidade do sinal Raman, que resulta da pequena fração de fótons que sofrem dispersão inelástica. Esta limitação pode ser parcialmente superada através do uso de lasers de alta potência, da otimização dos sistemas de recolha de sinal e da aplicação de técnicas avançadas, como a espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), que aumenta significativamente a sensibilidade da deteção (Vandenabeele, 2013). Outro desafio reside na interferência da fluorescência, que pode disfarçar o sinal Raman, especialmente em amostras biológicas ou orgânicas. No entanto, este problema pode ser amenizado pelo uso de lasers com comprimentos de onda na faixa do infravermelho próximo (NIR), que reduzem a probabilidade de fluorescência (Vandenabeele, 2013).

A espectroscopia Raman é uma técnica poderosa e versátil, que tem demonstrado grande potencial em diversas áreas de aplicação, desde a caracterização de materiais até ao diagnóstico médico. A sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura molecular das amostras, sem necessidade de preparação destrutiva, torna-a uma ferramenta valiosa em ambientes laboratoriais e clínicos.

Capítulo 4 . Metodologia

Este projeto enquadra-se no protocolo assinado entre o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e a Unidade Local de Saúde da Arrábida (ULSA), tendo sido aprovado pela comissão de ética do hospital, por isso a recolha das amostras foi realizada no Serviço de Nefrologia do hospital de São Bernardo, bem como a voluntários envolvidos no projeto LUMINA. Neste estudo foram utilizadas amostras biológicas.

4.1. Caracterização das amostras

4.1.1. Amostra de urina

As amostras de urina foram recolhidas de voluntários anónimos envolvidos no projeto LUMINA, bem como de doentes internados na unidade de Nefrologia do Hospital São Bernardo, após o preenchimento do consentimento informado (**Anexo 1**). O critério de inclusão para as amostras seguiu as normas definidas para o estudo, assegurando a análise de amostras provenientes tanto de indivíduos saudáveis quanto de doentes diagnosticados com LRA ou DRC. Além disso, foram utilizadas 6 amostras padrão de creatinina com concentrações conhecidas, como referência para a validação dos espectros obtidos.

4.1.2. Amostras Padrão

Foram analisadas 6 amostras padrão de creatinina, cuja concentração era conhecida, com o intuito de comparar os seus espectros com os obtidos pelas amostras de urina. Encontram-se representadas na **tabela 4.1**. as amostras de creatinina analisadas e a respetiva concentração.

Tabela 4.1 - Caracterização das amostras de creatinina.

Amostra	Concentração (mg/dL)
Cr1.25	1,25
Cr2.5	2,5
Cr5	5
Cr7.5	7,5
Cr10	10
Cr100	100

4.2. Instrumentação

A análise de várias amostras em estudo foi realizada no Laboratório de Optoelectrónica do ISEL.

Para a realização deste estudo, foi escolhida a utilização de técnicas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia Raman. Estas técnicas foram selecionadas devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades moleculares das amostras de urina, permitindo a deteção não invasiva de biomarcadores associados à LRA e à DRC (Lakowicz, 2006; Vandenabeele, 2013). Estas técnicas foram previamente validadas em estudos semelhantes para a identificação de biomarcadores renais, revelando-se altamente sensíveis e adequadas para a análise de líquidos biológicos sem necessidade de preparação invasiva das amostras (Fantoni et al., 2024).

A espectroscopia de fluorescência permite a monitorização de emissões de luz em diferentes comprimentos de onda, enquanto a espectroscopia Raman fornece uma identificação da composição molecular, essencial para distinguir variações entre amostras de indivíduos saudáveis e de doentes renais. Ambas as técnicas são cruciais para alcançar os objetivos do estudo, que incluem a comparação de padrões espectroscópicos entre grupos de doadores saudáveis e doentes (Lakowicz, 2006; Vandenabeele, 2013).

4.2.1. Espectroscópio de fluorescência

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Jasco FP-8300 Series (**Figura 4.1.**) Utilizou-se uma cuvette de quartzo com caminho ótico de 1 cm. A análise realizada teve como objetivo a monitorização dos espectros de fluorescência das amostras em função de diferentes comprimentos de onda de excitação e de emissão, ou seja, espectros de fluorescência tridimensionais (3D). Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.



Figura 4.1 - Espectrofluorímetro Jasco FP-8300 Series (imagem original).

4.2.2. Espectro Raman

O espectrómetro Raman utilizado foi todo montado no ISEL, e encontra-se representado na **Figura 4.2.**, assim como a descrição dos componentes utilizados bem com a sua montagem.

Este espectrómetro utiliza como fonte de excitação o Laser CPS532 da Thorlabs. Escolheu-se trabalhar na zona do visível com a intenção de aumentar a intensidade do sinal Raman. O comprimento de onda excitação é de 532 nanômetros, pois seria a intensidade em que a urina emite uma menor fluorescência quando atingida pelo feixe de luz.

O detetor é a câmara Blackfly GigE da marca FLIR, modelo BFLY-PGE-31S4M-C, tendo sido escolhido este devido à sua compatibilidade com o software de recolha dos espetros Raman (Software Spectrum Analyzer).

Inclui-se filtros de rejeição Rayleigh tipo *edge-pass* e uma janela de compensação. Como filtro foram utilizadas 2 lentes acromáticas, uma do modelo AC254-050-A e outra AC127-019-A, tendo uma fenda, a CRM1/M, e uma grade de difração.

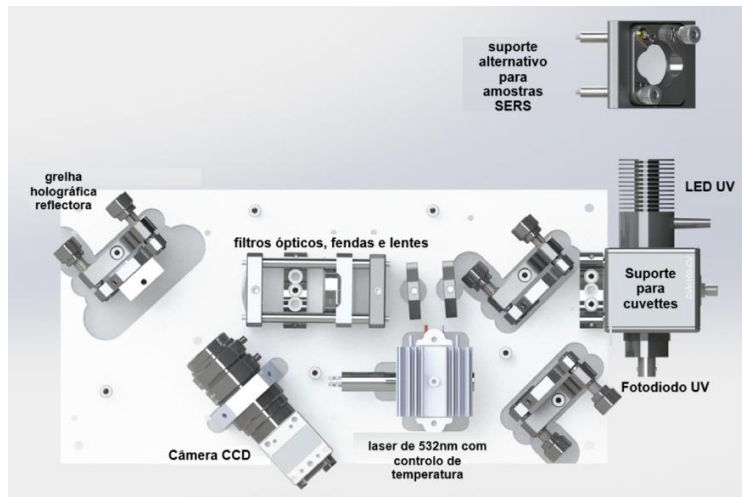


Figura 4.2 - Espectrómetro Raman usado na montagem do projeto LUMINA (Fantoni et al., 2024).

4.3. Calibração

Antes de se iniciar a análise através da espectroscopia de fluorescência ou espectroscopia Raman, foi necessário realizar uma calibração com uma amostra padrão conhecida, neste caso foi utilizada uma amostra de água destilada.

A amostra foi colocada numa cuvette e realizou-se primeiro a leitura no espectrofluorímetro recorrendo ao espectro 3D, sabendo que a água na sua forma pura não tem fluorescência.

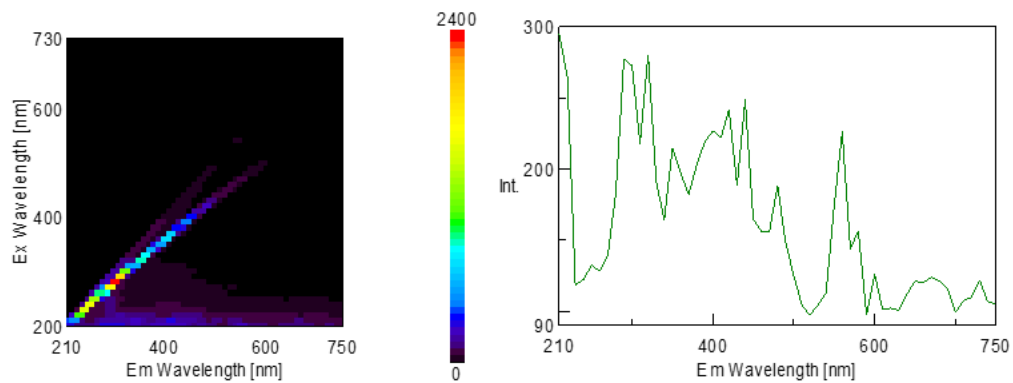


Figura 4.3 - Espectro 3D de uma amostra de água destilada (imagem original).

De seguida realizou-se a leitura dessa mesma amostra no espectroscópio Raman, sabendo que a água tem um pico principal na região de cerca de 3400 cm^{-1} (Ahmad & Iles, 2001).

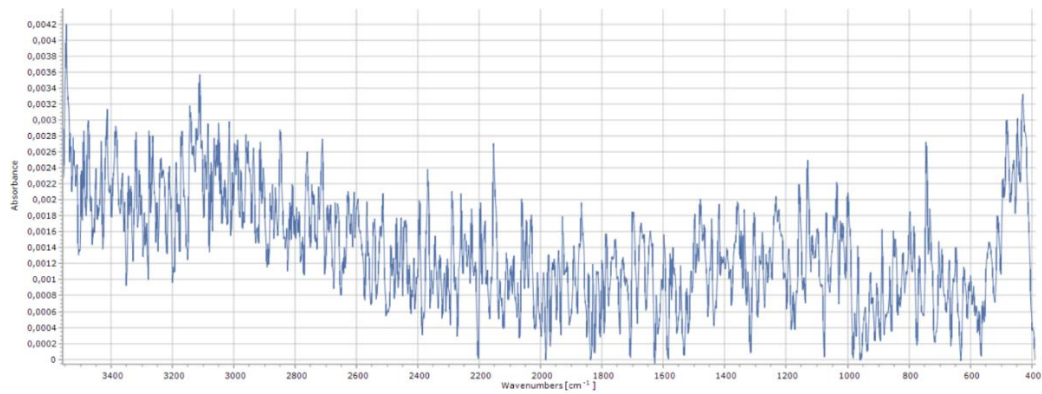


Figura 4.4 - Espectro Raman de uma amostra de água destilada (imagem original).

4.4. Preparação da amostra

As amostras de urina foram obtidas de pacientes voluntários. Para cada amostra, foi solicitado o preenchimento de um consentimento informado, no qual o voluntário concorda em participar do estudo (**Anexo 1**).

Para a recolha das amostras utilizou-se um frasco de recolha estéril adequado à recolha de urina, sem qualquer conservante. Informou-se o voluntário sobre a importância de descartar o primeiro jato de urina (Cristino, 2017).

Após a colheita, as amostras foram codificadas, mantendo-se a confidencialidade dos pacientes. As amostras terão a seguinte codificação:

P+ n^o- Amostra de paciente saudável, que não apresenta qualquer patologia nefrológica;

A+ n^o- Amostra de paciente com patologia nefrológica.

As amostras foram armazenadas de maneira apropriada (4°C) no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), garantindo a preservação das mesmas e a confidencialidade dos voluntários (Cristino, 2017).

4.5. Procedimento de análise de amostras

O processo de análise das amostras teve início na aquisição e conhecimento ou não dos parâmetros das mesmas.

Previamente a cada dia de utilização, foi verificada a calibração dos equipamentos através da mediação de uma amostra padrão, neste caso de água.

Foram retirados 4 mililitros de urina de cada tubo e transferidos para cuvetes de quartzo, efetuou-se a análise utilizando, primeiro o espectrofluorímetro, efetuando uma medição 3D. Criou-se um ficheiro com o nome da amostra para armazenamento dos respetivos espectros.

Depois efetuou-se a medição dessa mesma amostra através do espectroscópio Raman, utilizando para isso parâmetros de aquisição próprios, os espectros foram armazenados no formato CSV com a respetiva codificação das amostras, sendo posteriormente vistos recorrendo ao programa *Spectrum Analyzer*. Realizou-se o mesmo processo para as amostras padrão de creatinina.

É de salientar que todos os ensaios espectroscópicos foram realizados à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

Todos os dados necessários foram recolhidos e sujeitos a tratamento estatístico para análise comparativa. Após se proceder à análise de cada amostra, as mesmas foram descartadas de forma adequada, não se mantendo nenhuma amostra guardada.

4.6. Parâmetros de aquisição

4.6.1. Espectroscópio de fluorescência

Os parâmetros de aquisição dos espectros de fluorescência que serão analisados no Capítulo 4 foram obtidos através do programa Spectra Manager que efetua espectros 3D (3-D Spectra Measurement), ou seja, fez-se variar tanto o comprimento de onda de excitação (horizontal), como o de emissão (vertical).

4.6.2. Espectroscópio Raman

Os parâmetros de aquisição dos espectros Raman que serão analisados no Capítulo 5 foram os seguintes:

Número de imagens: 10

Tempo de Aquisição: 31622,777 milissegundos (ms)

Ganho: 1,5 dB

ROI: 128 px

4.7. Processamento de dados

Após a aquisição dos espectros de fluorescência e Raman, os mesmos foram identificados utilizando a codificação das amostras e armazenados num computador. No caso dos espectros de fluorescência, apenas foram mantidas as imagens, no caso dos espectros Raman, estes foram armazenados na extensão CSV para poderem ser analisados no software SpectraGryph.

A interpretação dos espectros inicialmente foi feita através da comparação dos espectros das amostras A e P, bem como das amostras padrão de creatinina. Com o intuito de se conseguir associar informação aos picos em causa, recorreu-se a revistas científicas como referência para a interpretação dos resultados.

Ao contrário do espectrofluorímetro cujos resultados não sofreram alteração, o espectro Raman devido a ter sofrido várias intervenções com intuito de melhorar a sua calibração, teve uma alteração nos espectros obtidos pelo que os espectros iniciais obtidos em comparação com os atuais apenas nos mostram como é importante calibrar adequadamente um equipamento, pois o ruído afeta os resultados obtidos, como é perceptível através da **Figura 4.5**. onde estão representados 2 espectros da mesma amostra com diferentes calibrações, sendo que a azul está representado o espectro da amostra após a primeira calibração e a laranja a mesma amostra, mas após ter sido efetuada a calibração adequada.

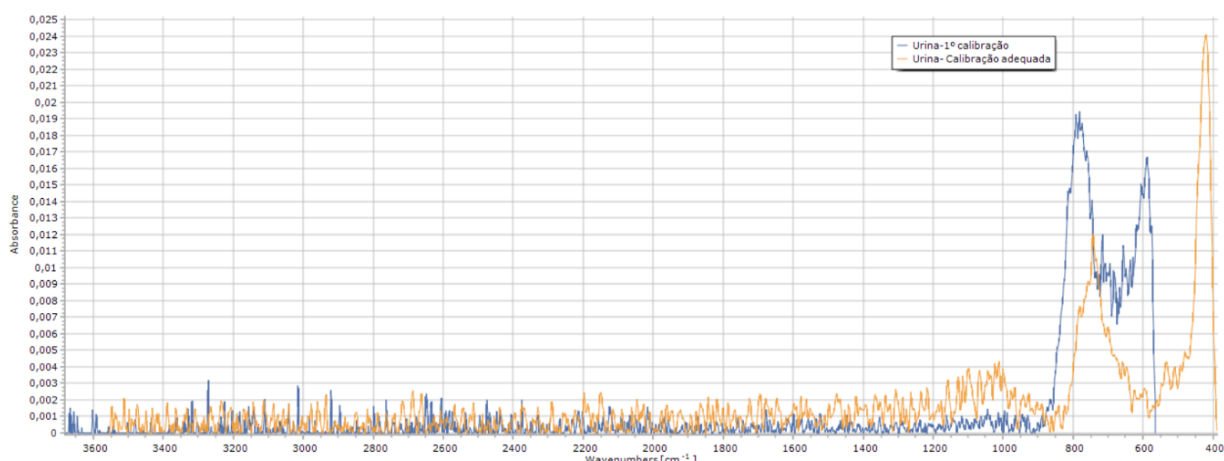


Figura 4.5 - Espectro Raman obtidos da mesma amostra com diferentes calibrações (imagem original).

Capítulo 5 . Análise e Discussão dos Resultados

Neste capítulo são apresentados os espectros obtidos utilizando o espectrofluorímetro bem como o espectrómetro Raman construído. Os espectros foram adquiridos utilizando o programa *Spectra Manager* e o *SpectraGryph*.

5.1. Amostras padrão de creatinina

As amostras padrão de creatinina, com concentrações de 1,25; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/dL, foram analisadas, obteve-se um espectro Raman com as 5 amostras (**Figura 5.1.**) e 5 espectros de fluorescência (**Figura 5.3.**).

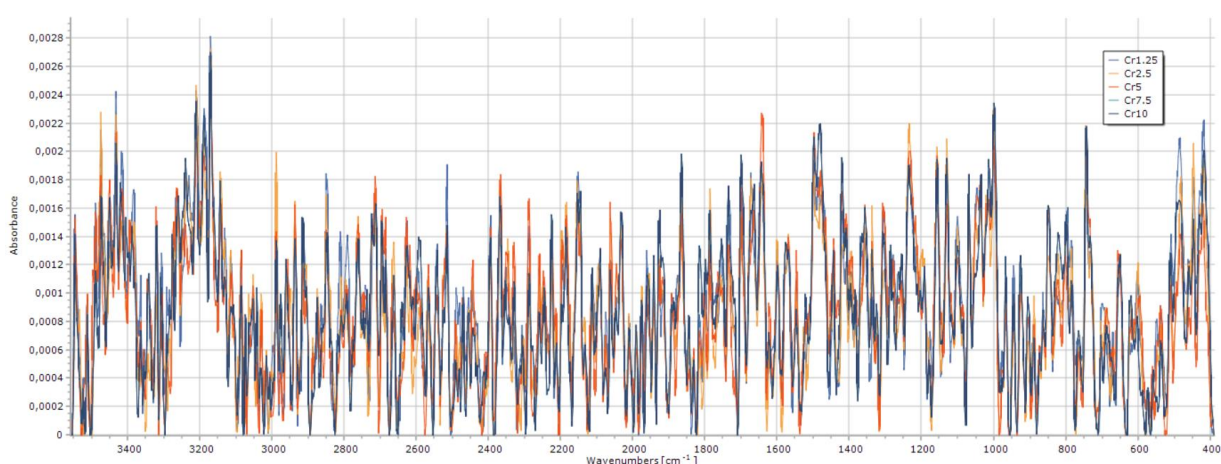


Figura 5.1 - Espectro Raman de 5 amostras padrão de creatinina com diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/dL) (imagem original).

Não foi possível retirar qualquer conclusão dos espectros obtidos, através da espectroscopia Raman, e com o intuito de perceber se seria devido a erros de calibração efetuou-se a medição de uma sexta amostra de creatinina com uma concentração de 100 mg/dL (**Figura 5.2.**), valor muito superior ao possível na urina.

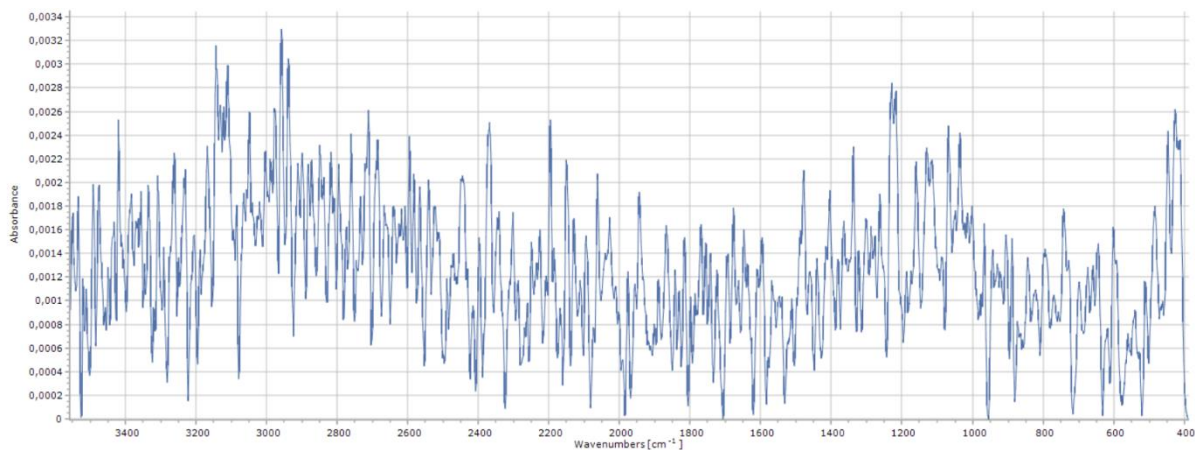


Figura 5.2 - Espectro Raman de uma amostra padrão de creatinina com uma concentração de 100 mg/dL (imagem original).

No espalhamento Raman, as moléculas polares, como é o caso da creatinina, podem influenciar os espectros de uma forma diferente quando comparadas com as moléculas apolares, isto deve-se às suas propriedades elétricas (Larkin, 2011).

Sabendo que o efeito de espalhamento Raman depende principalmente da polarizabilidade da molécula, ou seja, da facilidade com que o campo elétrico pode distorcer a nuvem eletrônica ao redor da molécula (Larkin, 2011).

O espalhamento Raman está relacionado com as mudanças na polarizabilidade da molécula durante as vibrações. Moléculas polares possuem um momento dipolar permanente, porém isso não afeta diretamente o Raman, uma vez que este é mais sensível às variações na polarizabilidade, e não ao momento dipolar (Larkin, 2011).

Todavia, vibrações que resultam em grandes mudanças na polarizabilidade tendem a gerar picos fortes no espectro Raman, enquanto vibrações que afetam mais o momento dipolar, mas não a polarizabilidade, podem ser mais visíveis no infravermelho (IR) (Larkin, 2011).

Contudo, em moléculas polares, as interações intermoleculares podem modificar as frequências vibracionais observadas no espectro Raman, deslocando picos ou alterando a intensidade dos mesmos (Larkin, 2011). Neste caso, devido a esse acontecimento, não é possível retirar qualquer tipo de conclusão quando se observa os picos, apenas se pode afirmar que esta técnica não é sensível para a creatinina.

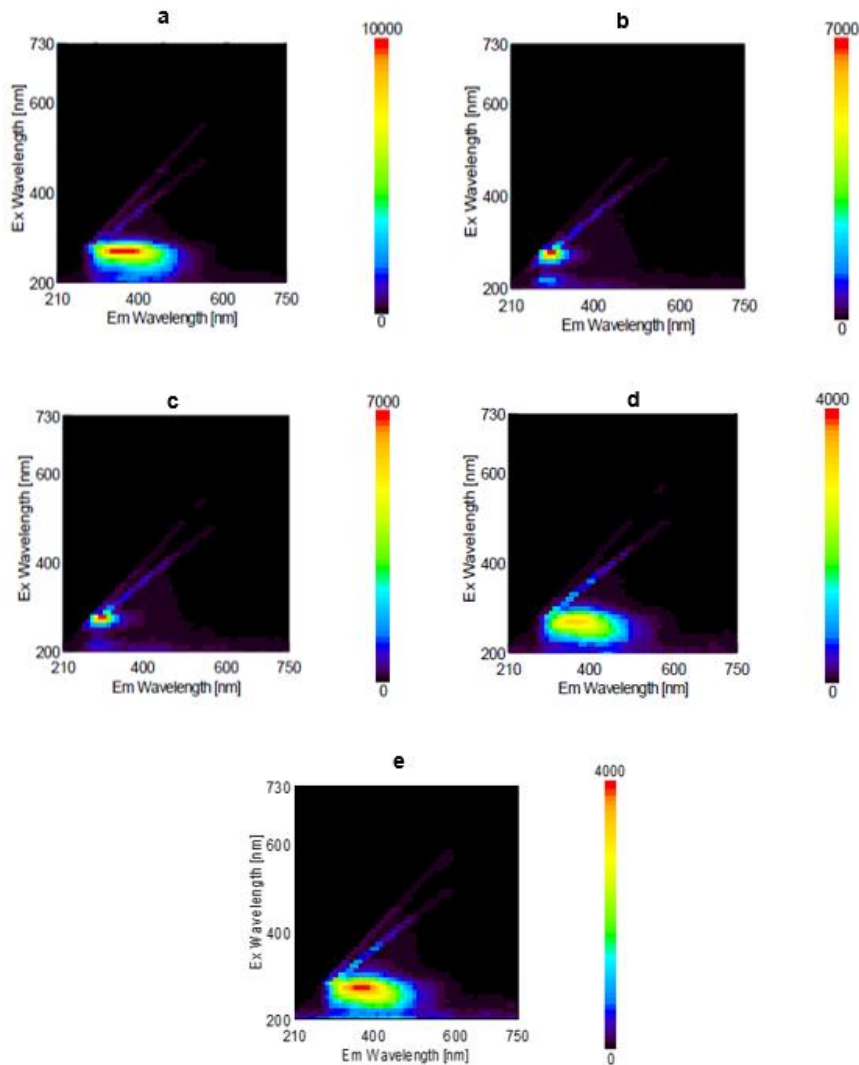


Figura 5.3 - Espectros de fluorescência de 5 amostras padrão de creatinina com diferentes concentrações (a-1,25 mg/dL; b-2,5 mg/dL; c-5 mg/dL; d-7,5 mg/dL e e-10 mg/dL) (imagem original).

Com as amostras de creatinina analisadas por fluorescência conseguiu-se perceber uma diferença na intensidade à medida que se aumenta a concentração de creatinina, contudo esse aumento não ocorre de forma proporcional, ou seja, numa amostra de creatinina com 10 mg/dL temos como intensidade máxima 4000 enquanto numa amostra com uma concentração de 2,5 mg/dL de creatinina temos 7000 de intensidade máxima. Este fenómeno deve-se ao facto de o equipamento fazer um auto-ajuste à medida que efetua as medições.

5.2. Amostras de urina

Foram analisadas mais 15 amostras de voluntários anónimos com intuito de comparar os espectros entre amostras de voluntários saudáveis com amostras de voluntários com DCR e LRA. Estando representadas na **Tabela 5.1.** as codificações das amostras analisadas.

Tabela 5.1 - Codificação das amostras analisadas.

Codificação	Patologia
P1	Saudável
P2	Saudável
P3	Saudável
P4	Saudável
P5	Saudável
P6	Saudável
P7	Saudável
A1	DCR
A2	DCR
A3	DCR
A4	DCR
A5	DCR aguda
A6	DCR
A7	LRA
A8	LRA

Estas amostras foram todas analisadas da mesma forma, com o intuito de não existir dúvida se o procedimento de análise teria sido igual em todas as amostras. Após a análise de cada amostras obtiveram-se os espectros, estes foram analisados e comparados conforme a literatura existente. Iniciou-se a análise pelas amostras saudáveis.

5.2.1. Amostras P

Na **Figura 5.4.** está representado o espectro Raman das amostras P e é possível verificar que todas as amostras de voluntários saudáveis têm um pico característico junto à região que se encontra entre os 500 e os 400 cm^{-1} . Esse pico pode ser representativo de dois compostos sendo eles o ácido úrico e o oxalato de cálcio.

O ácido úrico apresenta múltiplos picos Raman, contudo existem alguns estudos sugerindo que há bandas associadas às vibrações da estrutura heterocíclica na faixa dos 400 a 450 cm^{-1} , estando essas vibrações relacionadas com as deformações da estrutura molecular do anel (Wang et al., 2020). O oxalato de cálcio comumente presente nos cálculos renais, exibe picos Raman fortes em torno de 450 cm^{-1} devido às vibrações das ligações C-O (Frost & Weier, 2004).

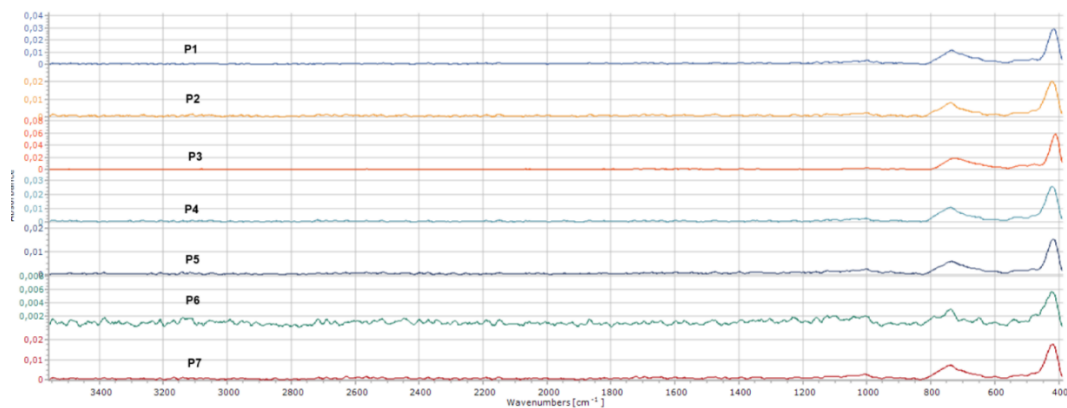


Figura 5.4- Espectro Raman das amostras de doadores saudáveis (imagem original).

Através dos espectros de fluorescência adquiridos (**Figura 5.5.**) é possível verificar que todas as amostras têm características distintas, contudo tem uma zona central vermelha similar entre elas, com a mesma intensidade.

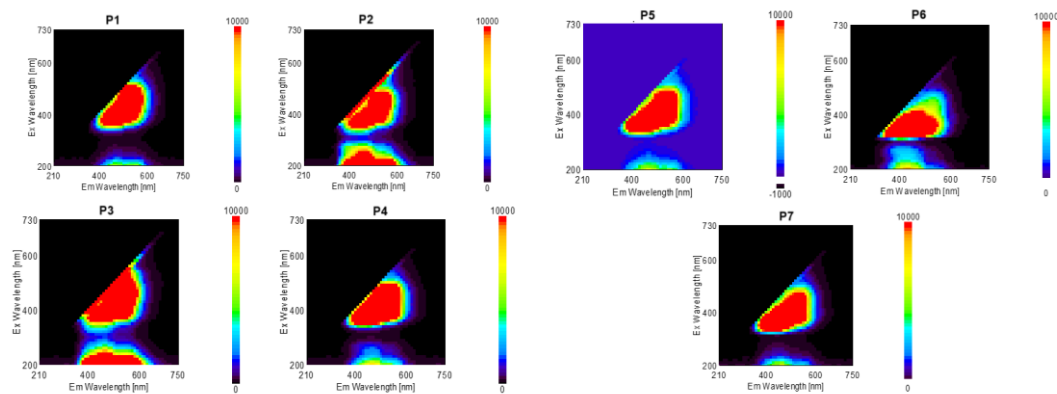


Figura 5.5 - Espectros de fluorescência das amostras de doadores saudáveis (imagem original)

5.2.2. Amostras de voluntários com DCR

Depois efetuou-se a análise das amostras de voluntários com DCR. Através do espectro Raman obtido (**Figura 5.6.**) é possível verificar que as amostras A1 até à A4 têm um pico característico junto à região entre os 800 e os 600 cm^{-1} , bem como o mesmo pico que as amostras saudáveis.

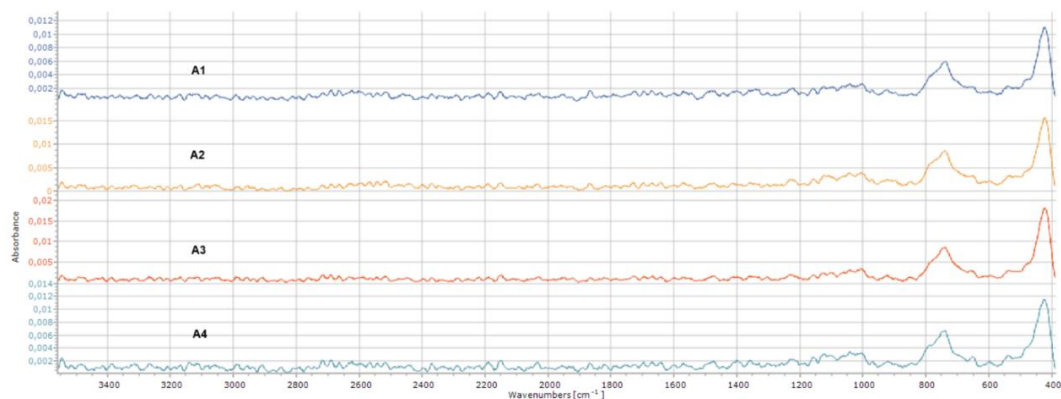


Figura 5.6 - Espectro Raman das amostras A1 à A4 (imagem original).

Na **Figura 5.7.** estão representados os espectros de fluorescência das amostras A1 à A4, que apresentam uma área central de coloração vermelha, indicando uma intensidade de fluorescência máxima semelhante. A forma oval e a distribuição da intensidade ao redor dessa zona central são relativamente similares entre as amostras, sugerindo que estas compartilham propriedades fluorescentes comuns. Estas 4 amostras apresentam um padrão central vermelho semelhante às amostras saudáveis, contudo a sua forma não é igual.

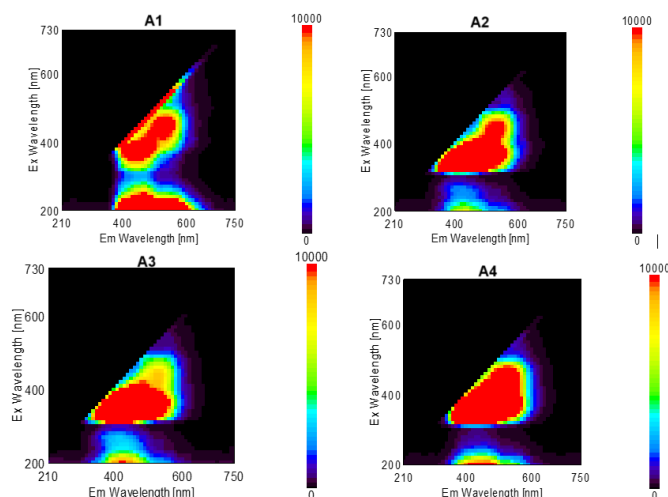


Figura 5.7 - Espectros fluorescência das amostras A1 à A4 (imagem original).

Em contraste, na **Figura 5.8.**, que mostra os espectros das amostras A5 e A6, é evidente que os perfis de fluorescência diferem consideravelmente dos observados nas amostras A1 à A4. Apesar de serem amostras de outros voluntários com DCR, era esperado que exibissem semelhanças com as primeiras amostras (A1 à A4). Contudo, as amostras A5 e A6 apresentam variações notáveis na distribuição e intensidade das regiões fluorescentes, o que sugere diferenças na composição ou nas características específicas dessas amostras de urina.

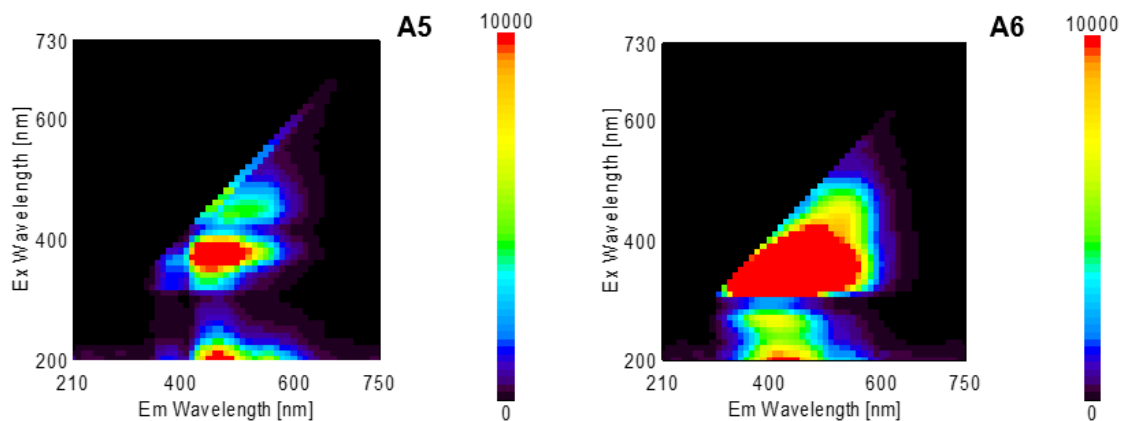


Figura 5.8 - Espectros fluorescência das amostras A5 e A6 (imagem original).

Tendo em conta que a amostra A5 apresentava uma cor avermelhada e o seu espectro é o que mais diverge dos restantes, podemos afirmar que é possível diferenciar esta amostra das demais com base nas suas características fluorescentes únicas. Esta diferença pode indicar uma variação significativa na composição química ou em algum parâmetro bioquímico específico, sugerindo que as propriedades fluorescentes da urina em doentes com DCR não são uniformes e podem variar entre indivíduos. Assim, o espectro da amostra A5 pode ser utilizado como uma referência para identificar ou caracterizar variações específicas dentro do grupo de pacientes com DCR, demonstrando que a espectroscopia de fluorescência tem potencial para distinguir entre diferentes perfis de amostras de urina.

Através do espectro Raman obtido das amostras A5 e A6 (**Figura 5.9.**) não foi possível retirar qualquer conclusão específica, ambos exibem um pico comum com diferentes intensidades junto da zona dos 400-500 cm^{-1} , contudo o espectro apresenta demasiado ruído, podendo isso dever-se a um tempo de aquisição baixo ou a um ganho elevado.

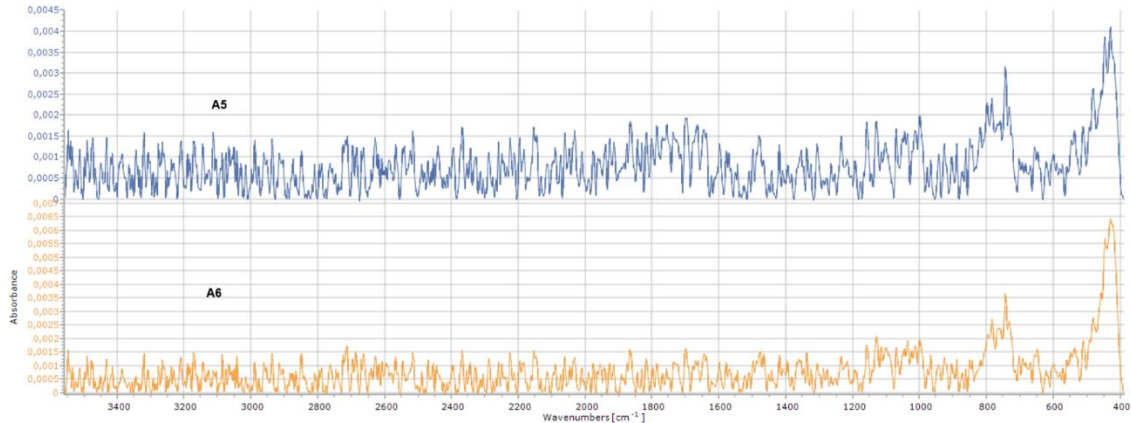


Figura 5.9 - Espectro Raman das amostras A5 e A6 (imagem original).

5.2.3. Amostras de voluntários com LRA

De seguida efetuou-se a análise das amostras de voluntários com LRA. Através do espectro Raman obtidos (**Figura 5.10.**) é possível observar que a amostra A7 apresenta picos mais distintos e uma linha de base mais elevada em comparação com a amostra A8, contudo na região que se encontra entre os 400-600 cm^{-1} a amostra A8 apresenta um pico de maior intensidade.

Isto pode sugerir uma maior presença de compostos que causam a dispersão de Raman, como proteínas, lipídios ou cristais. No entanto, esse efeito também pode ser causado pelo ruído excessivo, resultante de um tempo de aquisição curto.

A literatura indica que esses compostos são frequentemente encontrados em urinas mais concentradas e estão associados a estados de insuficiência renal (Jeng et al., 2022). A concentração elevada desses compostos reforça a hipótese de um estado de insuficiência renal na voluntária da amostra A7, uma vez que esses resíduos tendem a acumular-se quando a produção de urina é reduzida.

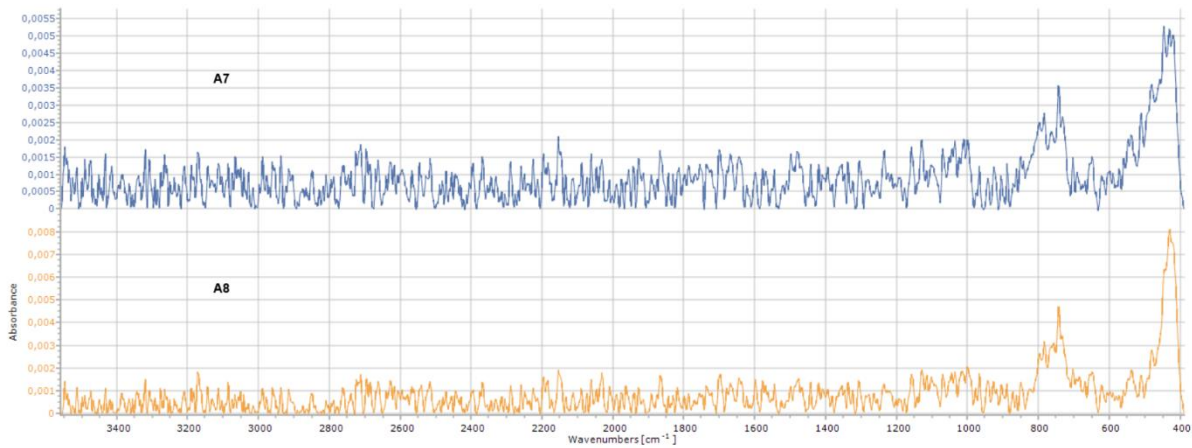


Figura 5.10 - Espectro Raman das amostras A7 e A8 (imagem original).

Através dos espectros de fluorescência adquiridos (**Figura 5.11.**) a amostra A7 revela áreas de alta intensidade (em tons de vermelho e laranja), especialmente na região de emissão entre 400-600 nanômetros (nm), com uma excitação em torno de 300-400 nm. Esse padrão indica uma maior concentração de compostos fluorescentes, como derivados de proteínas e resíduos metabólicos, que tendem a acumular-se em casos de insuficiência renal (Bellomo et al., 2012).

Essa acumulação pode estar relacionada ao facto do voluntário com a amostra A7 apresentar baixa produção de urina, o que resulta em uma urina mais concentrada.

Em oposição, a amostra A8 mostra um espectro de fluorescência mais semelhante ao das amostras saudáveis, não sendo por isso possível retirar uma conclusão específica. Sendo por isso possível afirmar que apesar de os voluntários terem a mesma patologia os seus espectros de fluorescência são completamente distintos.

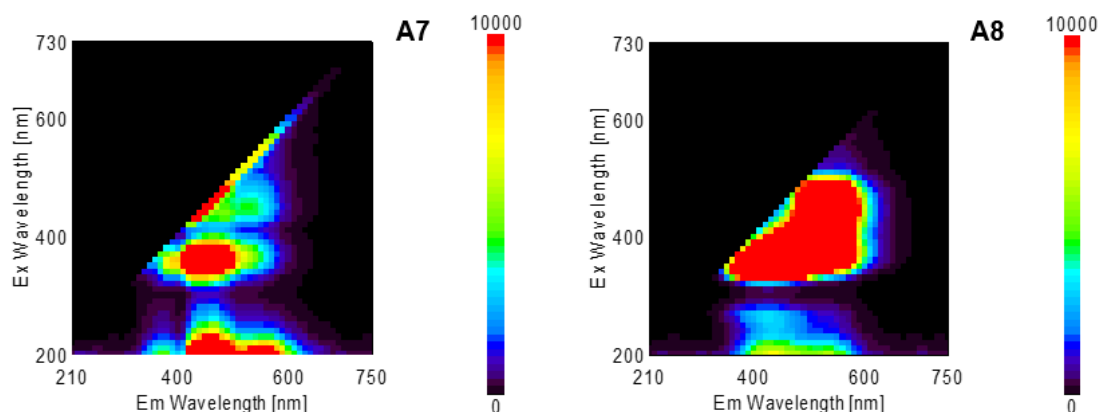


Figura 5.11 - Espectros fluorescência das amostras A7 e A8 (imagem original).

5.2.4. Comparação das amostras P com as amostras A

Quando comparamos uma amostra de um doador voluntário saudável com a amostra de um com DCR é de se esperar que haja diferenças nos seus espectros. No espectro Raman (**Figura 5.12.**) a principal diferença encontrada é a intensidade dos picos, ou seja, tanto no intervalo entre os 400-500 cm^{-1} , bem como no intervalo entre 600-800 cm^{-1} os picos na amostra A1 tem uma menor intensidade do que os da amostra P1.

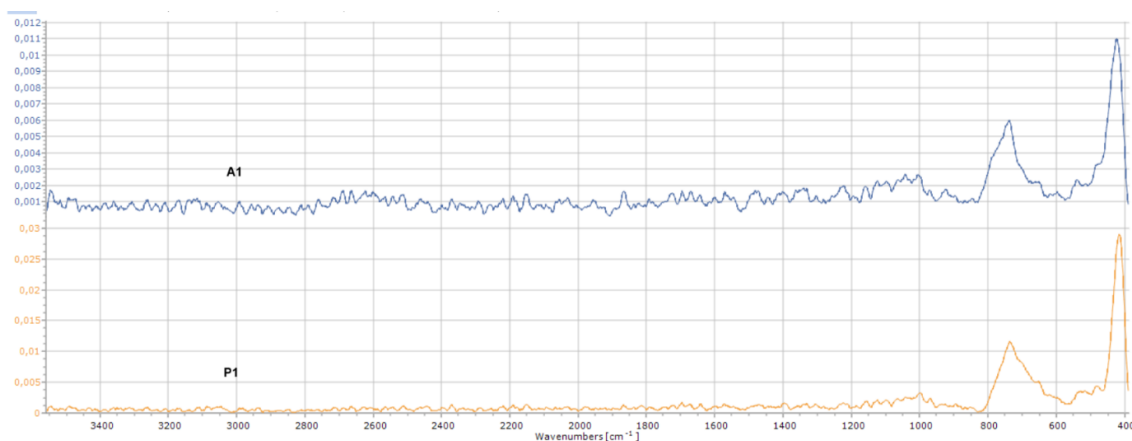


Figura 5.12 - Espectro Raman de amostras de doadores com DCR, amostra A1, e doadores saudáveis, amostra P1(imagem original).

No caso dos espectros de fluorescência, os mesmos são completamente diferentes para doadores saudáveis e para doadores com DCR. Comparando as amostras A1 e P1 é possível notar diferenças nas intensidades.

Comparando as amostras A1 e P1 (**Figura 5.9.**) é possível notar diferenças nos seus espectros de fluorescência, pois tem centros diferentes com formas distintas, enquanto a amostra A1 tem um coloração vermelha na forma oval, a amostra P1 tem um centro de coloração vermelha irregular que ao se estender para os lados perde intensidade passando a amarelo.

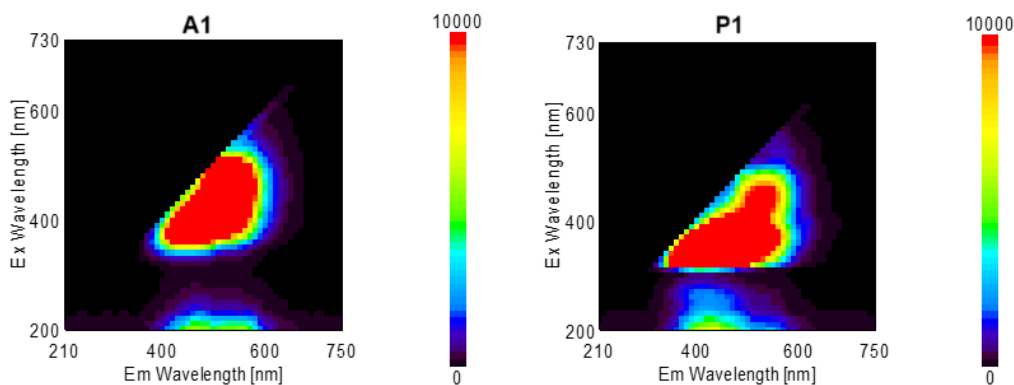


Figura 5.13 - Espectros fluorescência de amostras de doadores com DCR, amostra A1, e doadores saudáveis, amostra P1(imagem original).

Com base no artigo “*A review on fluorescence spectroscopic analysis of water and wastewater*” é possível perceber onde cada tipo de proteína se encontra no espectro de fluorescência (**Figura 5.10**), sendo assim possível estimar a localização de proteínas que contém na sua constituição triptofano (Khan et al., 2022).

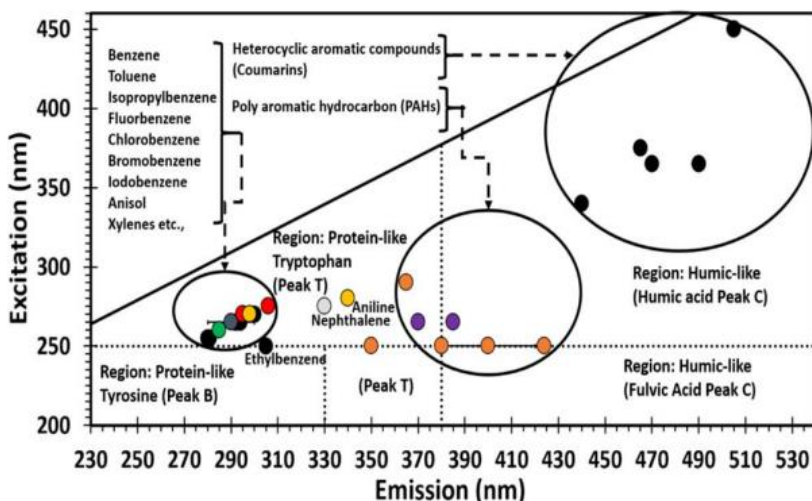


Figura 5.14 - Localização dos picos de fluorescência de compostos químicos (Khan et al., 2022).

Com base nos espectros de fluorescência obtidos para a amostra P1 e A1 (**Figura 5.13.**) e segundo a fonte referida e representada na **Figura 5.14.** podemos afirmar que ambas as amostras apresentam a presença de proteínas que na sua constituição tem triptofano, visto que a região central apresenta uma mancha de grande intensidade.

5.2.5. Limitações ao estudo

Uma das limitações mais significativas deste estudo foi o número reduzido de amostras, o que fez com que não fosse possível generalizar os resultados. Devido a contratempos burocráticos que levaram ao atraso da obtenção das amostras, houve a necessidade de uma reformulação da metodologia que tinha sido planeada e que se encontra no **Anexo 2**.

A escolha do comprimento de onda de excitação de 532 nm para o LED utilizado no espectroscópio Raman foi fundamentada pela expectativa de que esta frequência minimizaria a fluorescência emitida pela urina quando exposta ao feixe de luz. No entanto, verificou-se que esse comprimento de onda apresentou limitações na análise de amostras contendo compostos polares, devido à baixa sensibilidade para detecção de tais substâncias.

Além disso, a metodologia original incluía a comparação direta dos espectros de urina com dados clínicos, como os níveis de creatinina sérica e outros biomarcadores. Sem um número robusto de amostras, a correlação entre os resultados espectroscópicos e os dados clínicos não pôde ser estabelecida, reduzindo a possibilidade de quantificar os espectro e identificar padrões, limitando a aplicabilidade dos resultados à prática clínica.

Capítulo 6 . Conclusões

Este estudo demonstrou avanços significativos na aplicação de técnicas optoelectrónicas para a deteção não invasiva de biomarcadores associados à LRA e DCR, com particular destaque para a espectroscopia de fluorescência. Um dos principais objetivos deste trabalho foi a validação destas técnicas, em especial a espectroscopia de fluorescência e a espectroscopia Raman, para a identificação de biomarcadores renais em amostras de urina. Esse objetivo foi parcialmente alcançado, visto que a espectroscopia de fluorescência mostrou resultados promissores ao diferenciar amostras de urina com diferentes concentrações de creatinina, confirmando a sua viabilidade para a deteção de biomarcadores (objetivos 1 e 2). No entanto, a espectroscopia Raman não apresentou a sensibilidade esperada, possivelmente devido à interferência de moléculas presentes nas amostras, o que limitou a sua eficácia na análise de creatinina.

Outro objetivo fundamental foi a comparação entre os espectros de urina de doadores saudáveis e doentes com DRC, de modo a identificar padrões espectrais distintos que pudessem ser correlacionados com a presença de biomarcadores clínicos (objetivo 3). Os resultados obtidos revelaram diferenças claras nos espectros de fluorescência entre amostras de doadores saudáveis e de pacientes com DRC, sugerindo a presença de biomarcadores como o triptofano. Estas diferenças robustecem o potencial da espectroscopia de fluorescência como uma técnica promissora para o diagnóstico precoce de doenças renais.

Relativamente ao objetivo de proporcionar uma correlação entre os padrões espectrais e dados clínicos, a ausência de um número robusto de amostras clínicas limitou o alcance desse objetivo e dificulta assim a generalização dos resultados (objetivo 4).

Por fim, o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para o diagnóstico precoce de doenças renais foi parcialmente atingido (objetivo 5). A abordagem experimental com a utilização de espectroscopia de fluorescência mostrou-se eficaz na identificação de padrões específicos, indicando que esta técnica pode ser melhorada para uma futura aplicação em ambiente clínico. No entanto, para que essas técnicas se tornem viáveis na prática clínica, são necessárias melhorias nos equipamentos e um maior refinamento dos procedimentos de calibração.

Em suma, o estudo avançou na compreensão das técnicas optoelectrónicas e do seu potencial no diagnóstico de doenças renais, especialmente com a espectroscopia de fluorescência. Embora o trabalho tenha enfrentado desafios técnicos e logísticos, os resultados são promissores e indicam um caminho claro para futuros desenvolvimentos nesta área.

O futuro desta investigação apresenta várias oportunidades de desenvolvimento, tanto a nível técnico como clínico, de modo a validar plenamente o uso de técnicas optoelectrónicas no diagnóstico de doenças renais. Um dos principais focos deverá ser o aprimoramento das metodologias experimentais, nomeadamente através da otimização da calibração dos equipamentos, em especial o espectroscópio Raman, que não apresentou a sensibilidade esperada para biomarcadores como a creatinina. A introdução de técnicas avançadas de filtragem e redução de interferências nas amostras pode melhorar significativamente a qualidade dos espectros obtidos, aumentando assim a precisão dos resultados (Vandenabeele, 2013).

Outro aspeto essencial para o progresso deste trabalho é a colaboração direta com centros hospitalares e a obtenção de amostras clínicas. A recolha de amostras de pacientes com LRA e DRC permitirá uma análise mais robusta, possibilitando a comparação dos resultados espectroscópicos com dados clínicos, como níveis de creatinina sérica e outros biomarcadores estabelecidos. Este passo será fundamental para validar as técnicas utilizadas e aferir a sua viabilidade na prática clínica. Além disso, a inclusão de um maior número de amostras permitirá um tratamento estatístico mais rigoroso, fortalecendo as conclusões do estudo.

A espectroscopia de fluorescência demonstrou ser uma técnica promissora, e a sua aplicação pode ser expandida para a análise de outros biomarcadores associados a doenças renais. Estudos futuros poderão focar-se na utilização desta técnica para a identificação de novos biomarcadores que complementem a creatinina, como a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) ou a molécula de lesão renal aguda (KIM-1). A integração dessas moléculas nas análises espectroscópicas poderá aumentar a sensibilidade e especificidade dos diagnósticos, tornando o método mais completo e preciso.

De seguida, será necessário desenvolver uma plataforma portátil e acessível baseada nestas técnicas optoelectrónicas, que possa ser utilizada em ambientes clínicos. A criação de um dispositivo compacto, capaz de realizar análises rápidas e precisas de amostras de urina, facilitará o diagnóstico precoce de LRA e DRC, contribuindo para uma intervenção mais rápida e eficaz. Este desenvolvimento tecnológico será crucial para a implementação dos resultados desta investigação no dia-a-dia dos profissionais de saúde.

Por fim, o trabalho futuro deverá focar-se em três principais áreas: a melhoria dos procedimentos experimentais, a validação clínica através de amostras hospitalares, e o desenvolvimento de uma tecnologia acessível e aplicável em contextos clínicos. Com esses avanços, será possível consolidar o uso de técnicas optoelectrónicas como ferramentas eficazes no diagnóstico de doenças renais.

Capítulo 7 . Bibliografia

- Ahmad, S. R., & Iles, A. (2001). Pre-resonance Raman excitation profile of the 3400 cm⁻¹ mode of liquid water. *Journal of Raman Spectroscopy*, 32(8), 649–655. <https://doi.org/10.1002/jrs.717>
- Bellomo, R., Kellum, J. A., & Ronco, C. (2012). Acute kidney injury. *The Lancet*, 380(9843), 756–766. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61454-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2)
- Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., & Palevsky, P. (2004). Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*, 8(4), R204. <https://doi.org/10.1186/cc2872>
- Chapter 1: Definition and classification of CKD. (2013). *Kidney International Supplements*, 3(1), 19–62. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.64>
- Cristino, J. M. (2017). *Manual de colheitas Serviço de patologia clínica*.
- Fantoni, A., Fernandes, M., Fidalgo, J., Soto, M. K., Pereira, S. A., Moreno, A., Domingos, C., Correia, A. R., Sousa, H., Serafinelli, C., & Vieira, M. (2024). The LUMINA setup for a light-based urine monitoring and analysis. In M. T. Canva, A. Giannetti, J. Moreau, & H. Altug (Eds.), *Biophotonics in Point-of-Care III* (p. 26). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.3022182>
- Farrar, A. (2018). Acute Kidney Injury. *Nursing Clinics of North America*, 53(4), 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2018.07.001>
- Frost, R. L., & Weier, M. L. (2004). Thermal treatment of whewellite—a thermal analysis and Raman spectroscopic study. *Thermochimica Acta*, 409(1), 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00332-0](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00332-0)
- Hall, I. E., Yarlagadda, S. G., Coca, S. G., Wang, Z., Doshi, M., Devarajan, P., Han, W. K., Marcus, R. J., & Parikh, C. R. (2010). IL-18 and Urinary NGAL Predict Dialysis and Graft Recovery after Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(1), 189–197. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009030264>
- Ichimura, T., Asseldonk, E. J. P. v., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S., & Bonventre, J. V. (2008). Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 118(5), 1657–1668. <https://doi.org/10.1172/JCI34487>
- Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., & Sanicola, M. (1998). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a Putative Epithelial Cell Adhesion Molecule Containing a Novel Immunoglobulin Domain, Is Up-regulated in Renal Cells after Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4135–4142. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4135>

- Inker, L. A., Astor, B. C., Fox, C. H., Isakova, T., Lash, J. P., Peralta, C. A., Kurella Tamura, M., & Feldman, H. I. (2014). KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, 63(5), 713–735. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.01.416>
- Jasco. (n.d.). *FP-8000 Series. Fluorescence Spectrometers*. Retrieved July 10, 2024, from <https://jasco.co.uk/fluorescence.html>
- Jeng, M.-J., Sharma, M., Lee, C.-C., Lu, Y.-S., Tsai, C.-L., Chang, C.-H., Chen, S.-W., Lin, R.-M., & Chang, L.-B. (2022). Raman Spectral Characterization of Urine for Rapid Diagnosis of Acute Kidney Injury. *Journal of Clinical Medicine*, 11(16), 4829. <https://doi.org/10.3390/jcm11164829>
- Khan, M. F. S., Akbar, M., Wu, J., & Xu, Z. (2022). A review on fluorescence spectroscopic analysis of water and wastewater. *Methods and Applications in Fluorescence*, 10(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ac3d79>
- Krawczeski, C. D., Goldstein, S. L., Woo, J. G., Wang, Y., Piyaphanee, N., Ma, Q., Bennett, M., & Devarajan, P. (2011). Temporal Relationship and Predictive Value of Urinary Acute Kidney Injury Biomarkers After Pediatric Cardiopulmonary Bypass. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(22), 2301–2309. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.017>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
- Larkin, P. J. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68479-3>
- Lin, X., Yuan, J., Zhao, Y., & Zha, Y. (2015). Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *Journal of Nephrology*, 28(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s40620-014-0113-9>
- Lousa, I., Reis, F., Beirão, I., Alves, R., Belo, L., & Santos-Silva, A. (2020). New Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease Management—A Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 43. <https://doi.org/10.3390/ijms22010043>
- McMahon, G. M., & Waikar, S. S. (2013). Biomarkers in nephrology: Core Curriculum 2013. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 62(1), 165–178. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.12.022>
- McWilliam, S. J., Antoine, D. J., Jorgensen, A. L., Smyth, R. L., & Pirmohamed, M. (2018). Urinary Biomarkers of Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity in Cystic Fibrosis: Kidney Injury Molecule-1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *Scientific Reports*, 8(1), 5094. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23466-4>
- Melnikov, V. Y., Ecdler, T., Fantuzzi, G., Siegmund, B., Lucia, M. S., Dinarello, C. A., Schrier, R. W., & Edelstein, C. L. (2001). Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient

- mice from ischemic acute renal failure. *Journal of Clinical Investigation*, 107(9), 1145–1152. <https://doi.org/10.1172/JCI12089>
- Randers, E., & Erlandsen, E. J. (1999). Serum Cystatin C as an Endogenous Marker of the Renal Function – a Review. *Cclm*, 37(4), 389–395. <https://doi.org/10.1515/CCLM.1999.064>
- Sabbiseti, V. S., Waikar, S. S., Antoine, D. J., Smiles, A., Wang, C., Ravisankar, A., Ito, K., Sharma, S., Ramadesikan, S., Lee, M., Briskin, R., De Jager, P. L., Ngo, T. T., Radlinski, M., Dear, J. W., Park, K. B., Betensky, R., Krolewski, A. S., & Bonventre, J. V. (2014). Blood Kidney Injury Molecule-1 Is a Biomarker of Acute and Chronic Kidney Injury and Predicts Progression to ESRD in Type I Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(10), 2177–2186. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013070758>
- Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Kalandadze, A., Li, J.-Y., Paragas, N., Nicholas, T., Devarajan, P., & Barasch, J. (2006). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*, 15(4), 442–449. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000232886.81142.58>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (M. Finch, Ed.; 9th ed.).
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Vaidya, S. R., & Aeddula, N. R. (2024). *Chronic Kidney Disease*.
- Vaidya, V. S., Ford, G. M., Waikar, S. S., Wang, Y., Clement, M. B., Ramirez, V., Glaab, W. E., Troth, S. P., Sistare, F. D., Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Bobadilla, N. A., Mefferd, S. C., & Bonventre, J. V. (2009). A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney International*, 76(1), 108–114. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.96>
- Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A., & Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2), F517–F529. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00291.2005>
- Vaidya, V. S., Waikar, S. S., Ferguson, M. A., Collings, F. B., Sunderland, K., Gioules, C., Bradwin, G., Matsouaka, R., Betensky, R. A., Curhan, G. C., & Bonventre, J. V. (2008). Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clinical and Translational Science*, 1(3), 200–208. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2008.00053.x>
- Van Deventer, H. E., Paiker, J. E., Katz, I. J., & George, J. A. (2011). A comparison of cystatin C- and creatinine-based prediction equations for the estimation of glomerular filtration rate in black South Africans. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(5), 1553–1558. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq621>

- Vandenabeele, P. (2013). *Practical Raman Spectroscopy – An Introduction*. Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781119961284>
- Wang, C.-H., Zeng, J.-X., Chen, P.-C., & Chiang, H.-H. K. (2020). *Raman Spectroscopic Urine Crystal Detection and Clinical Significance Study on Urolithiasis Management* (pp. 122–128). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30636-6_18
- Yacouba, A., Bellali, S., Haddad, G., Mavros, N., Fontanini, A., Dubourg, G., Lagier, J., Raoult, D., & Bou Khalil, J. (2023). Use of scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray for urine analysis: A preliminary investigation. *Microscopy Research and Technique*, *86*(10), 1249–1257. <https://doi.org/10.1002/jemt.24301>
- Yang, J., Mori, K., Li, J. Y., & Barasch, J. (2003). Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *285*(1), F9–F18.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00008.2003>
- Younes-Ibrahim, M. S., & Younes-Ibrahim, M. (2022). Biomarkers and kidney diseases: a brief narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, *7*, 20–20.
<https://doi.org/10.21037/jlpm-22-1>

Anexo 1- Consentimento Informado ULSA



CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE PARA ATOS/INTERVENÇÕES DE SAÚDE NOS TERMOS DA NORMA N.º 015/2013, DA DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE

SERVIÇO DE NEFROLOGIA

Colar etiqueta do processo

Título do estudo

Acute Kidney Injury diagnosis through optoelectronic based urine analysis (Diagnóstico da lesão renal aguda através da análise optoelectrónica da urina)

1. Diagnóstico e/ou descrição da situação clínica

Diagnóstico da lesão renal aguda através da análise optoelectrónica da urina

2. Descrição do ato/intervenção, sua natureza e objetivo

Este estudo tem como objetivo obter uma confirmação laboratorial da correlação das propriedades espectroscópicas óticas da urina humana para a deteção de biomarcadores de doenças específicas ou com padrões característicos produzidos pela deteção de múltiplos biomarcadores. A análise de urina através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM), energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia de fluorescência e a espectroscopia Raman destes biomarcadores será produzida e comparada com dados clínicos, proporcionando a oportunidade de obter novas conclusões valiosas sobre a sua incidência.

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será aproveitada a partir da colheita de urina que irá efetuar. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão recolhidas como forma de apoio, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

As amostras serão armazenadas de maneira apropriada (4°C), garantindo a preservação das amostras e a confidencialidade dos pacientes. A colheita das amostras será realizada ao longo da semana, sendo as mesmas analisadas na semana seguinte no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação.

3. Benefícios

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

4. Riscos graves e riscos frequentes

Não existem.

5. Atos/intervenções alternativas fiáveis e cientificamente reconhecidas

Não existem.

6. Riscos de não tratamento.

Não estão em causa novas medidas terapêuticas, mas apenas um novo método de diagnóstico.

7. Participação

A participação neste estudo é voluntária e pode desistir em qualquer altura sem qualquer consequência.

8. Tratamento de dados

A informação é confidencial e anónima. A informação é registada pelos profissionais do Hospital de Setúbal que são investigadores neste estudo num ficheiro *Excel*, de modo anonimizado, e guardado nos computadores do gabinete médico do Serviço de Nefrologia. A informação anonimizada, isto é, codificada, será partilhada com uma investigadora do ISEL. Isto quer dizer que a investigadora terá acesso à sua informação clínica, mas não o poderá identificar.

Depois de se proceder à análise de cada amostra, as mesmas serão descartadas de forma adequada, não se mantendo nenhuma amostra guardada.

9. Publicação de resultados

Caso esta investigação venha a ser publicada, todos os dados serão mantidos anónimos e nenhuma identificação do participante constará na referida publicação.

10. Comissão de Ética

Antes de se iniciar, o estudo obterá o parecer favorável da Comissão de Ética da ULSA.

Profissional de Saúde

Confirmando que expliquei à pessoa abaixo indicada, de forma adequada e inteligível, os procedimentos necessários ao ato referido neste documento. Respondi a todas as questões que me foram colocadas e assegurei-me de que houve um período de reflexão suficiente para a tomada da decisão. Também garanti que, em caso de recusa, serão assegurados os melhores cuidados possíveis nesse contexto, no respeito pelos seus direitos.

Unidade de Saúde: Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E. Contacto: 265 549 000 (ext.: _____)

Nome (legível): _____ Cédula Profissional: _____

Assinatura: _____ Data: ____ / ____ / ____

Pessoa ou Representante Legal

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações se não estiver completamente esclarecido(a). Verifique se todas as informações estão corretas. Se tudo estiver conforme, então assine este documento.

Declaro ter compreendido os objetivos de quanto me foi proposto e explicado pelo profissional de saúde que assina este documento, ter-me sido dada oportunidade de fazer todas as perguntas sobre o assunto e para todas elas ter obtido resposta esclarecedora, ter-me sido garantido que não haverá prejuízo para os meus direitos assistenciais se eu recusar esta solicitação, e ter-me sido dado tempo suficiente para refletir sobre esta proposta.

Autorizo o ato indicado, bem como os procedimentos diretamente relacionados que sejam necessários no meu próprio interesse e justificados por razões clínicas fundamentadas.

Não autorizo o ato indicado, bem como os procedimentos diretamente relacionados que sejam necessários no meu próprio interesse e justificados por razões clínicas fundamentadas.

Nome: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura _____

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE

(se o menor tiver discernimento deve também assinar em cima)

Nome: _____

Grau de Parentesco ou Tipo de Representação: _____

Assinatura: _____

Cópia para o doente

Anexo 2- Metodologia apresentada para aprovação pelo hospital

Este projeto enquadra-se no protocolo assinado entre o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e a Unidade Local de Saúde da Arrábida (ULSA), por isso a recolha das amostras será realizada no Serviço de Nefrologia do hospital, que de forma paralela medirá como habitualmente a função renal com SCr e SCysC e na urina medirá densidade, ionograma, creatinina urinária no mesmo dia do estudo. Todas as análises específicas do estudo serão de responsabilidade do ISEL que transportará as amostras de urina ao seu laboratório.

1. Recolha das amostras no Hospital

As amostras são recolhidas no internamento de Nefrologia do Hospital São Bernardo (ULSA), em Setúbal, seguindo os procedimentos padrão estabelecidos pela equipa médica.

As amostras de urina serão obtidas de pacientes voluntários. Para cada amostra, será solicitado o preenchimento de um consentimento informado, no qual o paciente concorda em participar do estudo.

Para a recolha das amostras deve-se utilizar um tubo adequado à recolha de urina, sem qualquer conservante. Deve-se avisar o paciente que quando urinar para o tubo deve dispensar o primeiro jato (Cristino, 2017).

Após a colheita, as amostras serão codificadas, para que se mantenha a confidencialidade dos pacientes. As amostras terão a seguinte codificação:

S- Amostra de paciente saudável, que não apresenta qualquer patologia nefrológica; D- Amostra de paciente com DRC por algum tipo de patologia nefrológica.

LRA- Amostra de paciente diagnosticado com lesão renal aguda

Estas amostras deveram ser mantidas refrigeradas a uma temperatura entre 2° e 8°C, após uma semana deveram ser congeladas a -20° C (Cristino, 2017).

As amostras serão armazenadas de maneira apropriada (4°C) no Serviço de Nefrologia, garantindo a preservação das amostras e a confidencialidade dos pacientes. A colheita das amostras será realizada ao longo da semana e a sua recolha será feita aos sábados, sendo as mesmas analisadas na semana seguinte no ISEL.

2. Análise das amostras no ISEL

Após receção das amostras no ISEL, estas serão subdivididas em dois tubos designados como A e B, sendo armazenados ambos os tubos a uma temperatura entre os 2º e 8º C.

No tubo A, as amostras serão mantidas sem qualquer tratamento, enquanto no tubo B, as amostras serão submetidas a centrifugação a 800 rpm durante 5 minutos (Yacouba et al., 2023).

Serão retirados 4 mililitros de urina de cada tubo A e transferidos para cuvetes de quartzo, a fim de efetuar a leitura nos equipamentos de espectroscopia Raman e espectroscopia de fluorescência.

Após centrifugação, o sobrenadante de cada tubo B será removido para análise por espectroscopia de fluorescência e espectroscopia Raman, enquanto o *pellet* resultante será submetido a secagem e posterior análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Todos os dados obtidos serão recolhidos e sujeitos a tratamento estatístico para análise comparativa.

Depois de se proceder à análise de ambos os tubos (A e B) de cada amostra, as mesmas serão descartadas de forma adequada, não se mantendo nenhuma amostra guardada.