

## **Sistema *Point of Care* baseado em espectroscopia Raman para a deteção de doenças renais**

CATARINA FILIPA DA SILVA DOMINGOS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

### Orientadores:

Doutor Alessandro Fantoni  
Doutor Luís Miguel Fernandes  
Doutora Sofia de Azeredo Pereira

### Júri:

Presidente: Doutor João Pedro Barrigana Ramos da Costa  
Vogais: Doutora Sara Fateixa  
Doutor Alessandro Fantoni

Dezembro de 2024



# **INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

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

## **Sistema *Point of Care* baseado em espectroscopia Raman para a deteção de doenças renais**

CATARINA FILIPA DA SILVA DOMINGOS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

### Orientadores:

Doutor Alessandro Fantoni (CTS-ISEL)

Doutor Luís Miguel Fernandes (CTS-ISEL)

Doutora Sofia de Azeredo Pereira (iNOVA4Health, NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa)

### Júri:

Presidente: Doutor João Pedro Barrigana Ramos da Costa (ISEL)

Vogais: Doutora Sara Fateixa (Universidade de Aveiro)

Doutor Alessandro Fantoni (CTS-ISEL)

**Dezembro de 2024**



## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Alessandro Fantoni, orientador desta dissertação, agradeço por toda a orientação e apoio durante este processo. A sua orientação não foi apenas fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, contribuiu também para o meu crescimento académico e pessoal. Agradeço por ter confiado em mim e por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este projeto.

Ao Professor Doutor Luís Miguel Fernandes, orientador desta dissertação, expresso o meu agradecimento pelo auxílio prestado, particularmente na montagem e no alinhamento do sistema desenvolvido. Sem a sua ajuda e conhecimentos, a realização deste projeto não teria sido possível.

À Professora Doutora Sofia de Azeredo Pereira, orientadora desta dissertação, agradeço por toda a ajuda, disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos ao longo de todo o projeto. Agradeço, em particular, pelo fornecimento das amostras de urina, essenciais para a validação do sistema desenvolvido.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento do projeto LUMINA (*Light Based Urine Monitoring and Analysis*), concedido através do concurso IDI&CA 2023.

Aos meus colegas que me acompanharam ao longo de toda a minha trajetória no ISEL, tanto na licenciatura como no mestrado, quero expressar a minha profunda gratidão. Todos os momentos de apoio e amizade partilhados ao longo destes anos terão sempre um lugar especial no meu coração. Sem vocês esta caminhada teria sido muito mais difícil e, certamente, menos significativa.

Aos meus Pais, um agradecimento muito especial por todo o apoio, amor e motivação constantes. O vosso incentivo e confiança foram fundamentais ao longo de todo o meu processo académico. Este trabalho é tão vosso quanto meu.

Ao meu irmão, espero que o meu percurso te inspire de alguma forma e que nunca duvides das tuas capacidades.

Ao meu namorado, agradeço por acreditar constantemente nas minhas capacidades e por tornar a vida mais leve. A tua presença ao longo deste caminho tornou-o mais sereno e alegre.

Aos meus familiares e amigos por me apoiarem, tanto neste projeto como na vida, obrigada.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a elaboração deste projeto, o meu sincero obrigada!

## Resumo

Este trabalho insere-se no projeto LUMINA, cujo objetivo futuro é o desenvolvimento de um sistema portátil para determinar o estado renal do paciente através da análise de urina. Este sistema terá três abordagens de detecção, a presente dissertação concentra-se exclusivamente no desenvolvimento da parte da espectroscopia Raman.

O sistema Raman foi construído com base na metodologia de desenvolvimento da *Starter Edition*, sistema projetado pelos engenheiros responsáveis do *site OpenRAMAN*.

A otimização do sistema foi dividida em duas partes: otimização da fonte de radiação, o laser, e otimização dos parâmetros de aquisição do *software* utilizado para obter os espectros Raman. Numa primeira fase, determinou-se a Largura à Meia Altura do pico do laser a diferentes temperaturas de funcionamento, de forma a selecionar a temperatura que minimizava este parâmetro. Para determinar o impacto que a temperatura de funcionamento do laser tem no espectro Raman, adquiriu-se o espectro do etanol a diferentes temperaturas. Com esta análise concluiu-se que a temperatura de funcionamento do laser que o otimiza é 30°C. Na segunda fase de otimização, obteve-se o espectro do etanol ajustando os parâmetros de aquisição do *software* utilizado, com o intuito de identificar quais os parâmetros que mais significativamente impactam a qualidade do espectro final. Observou-se que estes parâmetros são o tempo de aquisição e o número de imagens utilizadas.

Para validar o sistema Raman desenvolvido, adquiriu-se 5 espectros de diferentes amostras de urina. Com esta validação, concluiu-se que se o sistema desenvolvido é consistente nas suas medições e sensível às variações de concentração dos compostos presentes na urina.

Por último, desenvolveu-se uma rede de aprendizagem automática para a classificação de espectros Raman. O treino e teste da rede foram efetuados com soluções com várias concentrações de álcool. A otimização da rede foi efetuada variando os seus hiperparâmetros e determinando a sua precisão, exatidão e tempo de treino.

**Palavras-chave:** Espectroscopia Raman, sensor, otimização, instrumentação, diagnóstico, doença renal.



## Abstract

This work is part of the LUMINA project, whose future goal is the development of a portable optoelectronic system to determine the patient's renal status through urine analysis. This system will have three detection approaches, the present dissertation focuses exclusively on the development of the Raman spectroscopy part.

The Raman system was built based on the development methodology of the *Starter Edition*, a system designed by the engineers responsible for the *OpenRAMAN website*.

The optimization of the system was divided into two parts: optimization of the radiation source, the laser, and optimization of the acquisition parameters of the software used to obtain the Raman spectra. In the first phase, the Width at Mid-Height of the laser peak at different operating temperatures was determined, in order to select the temperature that minimized this parameter. To determine the impact that laser operating temperature has on the Raman spectrum, the ethanol spectrum was acquired at different temperatures. With this analysis, it was concluded that the operating temperature of the laser that optimizes its operation is 30°C. In the second phase of optimization, the ethanol spectrum was obtained by adjusting the acquisition parameters of the software used, to identify which parameters most significantly impact the quality of the final spectrum. It was observed that these parameters are the acquisition time and the number of images used.

To validate the developed Raman system, 5 spectra of different urine samples were acquired. With this validation, it was concluded that the developed system is consistent in its measurements and sensitive to variations in the concentration of compounds present in urine.

Finally, a machine learning network for Raman spectrum classification was developed. The training and testing of the network was carried out with solutions with various concentrations of alcohol. The optimization of the network was carried out by varying its hyperparameters and determining its precision, accuracy and training time.

**Keywords:** Raman spectroscopy, sensor, optimization, instrumentation, diagnosis, kidney disease.



## Lista de abreviaturas

### A

---

AKI	Lesão Renal Aguda
AKD	Doenças e Distúrbios Renais Agudos
AI	Inteligência Artificial

### C

---

CKD	Doença Renal Crónica
CNC	Controlo Numérico Computorizado

### D

---

DPSS	Laser de Estado Sólido Bombeado por Díodo
------	---

### E

---

EPO	Eritropoietina
ESRD	Doença Renal em Estágio Final
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

### F

---

FWHM	Largura à Meia Altura do Pico
------	-------------------------------

### G

---

GFR	Taxa de Filtração Glomerular
-----	------------------------------

### I

---

IL-18	Interleucina 18
-------	-----------------

### M

---

ML	Aprendizagem Automatizada
----	---------------------------

### N

---

NGAL	Lidocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica
------	---

### R

---

ROI	Região de Interesse
-----	---------------------

### S

---

sCr	Nível de Creatinina no Soro
SERS	Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície
SNR	Relação Sinal-Ruído

## **T**

---

TAC	Tomografia Axial Computorizada
-----	--------------------------------

## **U**

---

UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
u.a.	Unidades Arbitrárias



# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iv
Índice .....	ix
Índice Figuras .....	xii
Índice Tabelas .....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Motivação.....	2
1.2. Objetivo .....	2
1.3. Organização da dissertação .....	3
1.4. Contribuições da dissertação .....	3
1.5. Divulgação científica.....	4
2. Estado de Arte.....	5
2.1. Interação da radiação eletromagnética com a matéria.....	5
2.2. Espetroscopia Raman .....	6
2.3. Aplicação da Espetroscopia Raman na área da biomédica.....	8
2.4. Doenças Renais .....	9
2.5. Abordagem Raman para deteção de doenças renais.....	12
2.6. Modelo de Aprendizagem Supervisionada .....	14
3. Desenvolvimento do sistema LUMINA .....	17
3.1. Componentes do sistema Raman.....	17
3.1.1. Fonte de radiação .....	18
3.1.2. Suporte para cuvetes .....	21
3.1.3. Elementos óticos .....	21
3.1.4. Detetor / Espetrómetro .....	22
3.1.5. <i>Software</i> de recolha de dados .....	22
3.2. Montagem do sistema Raman .....	26
3.3. Alinhamento e calibração do sistema Raman.....	35
3.4. Otimização dos componentes do sistema .....	39
3.4.1. Fonte de radiação .....	39
3.4.2. Parâmetros de aquisição do <i>software</i> Spectrum Analyzer.....	44
4. Aquisição de espectros de urina com o sistema LUMINA .....	48
5. Desenvolvimento da Rede de Aprendizagem Supervisionada .....	49
5.1. Aquisição dos dados para o treino e teste da rede de aprendizagem .....	49

5.2. Descrição do processo para o desenvolvimento da rede .....	50
5.3. Otimização da rede de aprendizagem desenvolvida.....	56
6. Discussão dos resultados .....	59
7. Conclusões e perspectivas futuras .....	63
Anexos .....	64
Referências bibliográficas.....	68



## Índice Figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama dos processos de dispersão Rayleigh e Raman (Stokes e Anti-Stokes), adaptado de [12]. .....	6
<b>Figura 2.</b> Divisão dos dados para treino e teste do modelo. ....	16
<b>Figura 3.</b> Setup sistema LUMINA, adaptado de [45]. .....	17
<b>Figura 4.</b> Intensidade da fluorescência emitida pela urina em função do comprimento de onda de cada laser (nm). [45]. .....	18
<b>Figura 5.</b> Software <b>MTD Series</b> para o controlo da temperatura do laser. ....	20
<b>Figura 6.</b> Vista superior do suporte de amostra utilizado. ....	21
<b>Figura 7.</b> Painel configuração do software <b>Spectrum Analyzer</b> . ....	25
<b>Figura 8.</b> Componentes para a montagem do grupo de lentes e fenda, adaptado de [49]. .....	26
<b>Figura 9.</b> Setup para o alinhamento da primeira lente acromática com o suporte rotativo da fenda, adaptado de [49]. .....	27
<b>Figura 10.</b> Conjunto das lentes e fenda rotativa. ....	27
<b>Figura 11.</b> Fixação do conjunto de lentes, fenda e base para o suporte de amostra na baseplate, adaptado de [49]. .....	28
<b>Figura 12.</b> Setup para fixação da câmara à baseplate, adaptado de [49]. ....	29
<b>Figura 13.</b> Componentes do conjunto da rede de difração, adaptado de [49]. .....	30
<b>Figura 14.</b> Detalhe do suporte fabricado para acomodar o laser <b>CPS532</b> e o sistema de controlo de temperatura. ....	31
<b>Figura 15.</b> Controlador da temperatura de funcionamento do laser. ....	31
<b>Figura 16.</b> Montagem para o alinhamento feixe do laser com o eixo ótico do sistema Raman. ....	32
<b>Figura 17.</b> Vista superior do sistema Raman desenvolvido. ....	33
<b>Figura 18.</b> Detalhes da ligação da câmara ao computador. ....	33
<b>Figura 19.</b> Conexão da câmara <b>BFLY-PGE</b> ao software. ....	34
<b>Figura 20.</b> Montagem para o alinhamento do sistema utilizando uma fonte de luz fluorescente. ....	35
<b>Figura 21.</b> Espectro da lâmpada fluorescente obtido pela câmara, após alinhamento. ....	36
<b>Figura 22.</b> Análise espectral da lâmpada fluorescente utilizada, com a confirmação dos picos a 542,4 nm e a 546,5 nm. ....	37
<b>Figura 23.</b> Calibração espectral da câmara com lâmpada Néon. ....	38
<b>Figura 24.</b> Setup para obtenção do espectro do laser <b>CPS532</b> . ....	39
<b>Figura 25.</b> Espectro do laser <b>CPS532</b> com temperatura de funcionamento de 20°C. ....	40
<b>Figura 26.</b> Espectro do laser <b>CPS532</b> a 20°C, adquirido sem intermédio da fibra ótica. ....	41
<b>Figura 27.</b> Influência da temperatura de funcionamento do laser na FWHM do seu pico principal. ....	42
<b>Figura 28.</b> Espectro Raman do etanol a temperaturas de funcionamento do laser de 25°C, 30°C e a 35°C. ....	43

<b>Figura 29.</b> Impacto do tempo de exposição na qualidade do espectro Raman de etanol.....	44
<b>Figura 30.</b> Impacto do ganho na qualidade do espectro Raman de etanol. ....	46
<b>Figura 31.</b> Impacto do número médio de imagens na qualidade do espectro Raman de etanol. ....	47
<b>Figura 32.</b> Espectro Raman das 5 amostras de urina fornecidas pela NOVA Medical School.....	48
<b>Figura 33.</b> Espectro Raman da solução 100% Metanol.....	50
<b>Figura 34.</b> Código desenvolvido para o carregamento e preparação dos dados para serem utilizados pela rede de aprendizagem. ....	51
<b>Figura 35.</b> Tabela mostrada ao utilizador, resultante da função countEachLabel(imds). ....	51
<b>Figura 36.</b> Código desenvolvido para a divisão dos dados no conjunto de treino e de teste. ....	51
<b>Figura 37.</b> Tabelas mostradas ao utilizador, resultantes da função countEachLabel(imdsTraining) e countEachLabel(imdsTest), respetivamente.....	52
<b>Figura 38.</b> Código desenvolvido para definir a estrutura e as várias camadas da rede de aprendizagem. ....	53
<b>Figura 39.</b> Código desenvolvido para configurar os hiperparâmetros do treino da rede. ....	54
<b>Figura 40.</b> Código desenvolvido para treinar a rede. ....	54
<b>Figura 41.</b> Código desenvolvido para avaliação da rede, através do cálculo da exatidão e da precisão da rede e da realização da matriz de confusão. ....	55
<b>Figura 42.</b> Detalhes de cada Epoch, tendo como hiperparâmetros de treino: MaxEpoch = 20, InitialLearningRate = 0,001 e MiniBatchSize = 64. ....	56
<b>Figura 43.</b> Matriz de confusão e precisão da rede, tendo como hiperparâmetros de treino: MaxEpoch = 20, InitialLearningRate = 0,001 e MiniBatchSize = 64. ....	56
<b>Figura 44.</b> Detalhes de cada Epoch, tendo como hiperparâmetros de treino: MaxEpoch = 20, InitialLearningRate = 0,001 e MiniBatchSize = 32. ....	57
<b>Figura 45.</b> Matriz de confusão e precisão da rede, tendo como hiperparâmetros de treino: MaxEpoch = 20, InitialLearningRate = 0,001 e MiniBatchSize = 32. ....	57
<b>Figura 46.</b> Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 25°C. ....	64
<b>Figura 47.</b> Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 30°C. ....	64
<b>Figura 48.</b> Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 35°C. ....	65
<b>Figura 49.</b> Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 40°C. ....	65
<b>Figura 50.</b> Espectro Raman da solução 20% Etanol e 80% Metanol. ....	66
<b>Figura 51.</b> Espectro Raman da solução 50% Etanol e 50% Metanol. ....	66
<b>Figura 52.</b> Espectro Raman da solução 80% Etanol e 20% Metanol. ....	66
<b>Figura 53.</b> Espectro Raman da solução 90% Etanol e 10% Metanol. ....	67



## Índice Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Exemplo de uma matriz de confusão.....	15
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos materiais necessários para a preparação do grupo de lentes e fenda.....	26
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos materiais necessários para a fixação do grupo de lentes, fenda e base para o suporte de amostra à baseplate. ....	28
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos materiais necessários para a fixação do detetor na baseplate.....	28
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos materiais necessários para a montagem do conjunto da rede de difração... ..	29
<b>Tabela 6.</b> Descrição dos materiais necessários para a fixação dos restantes componentes do sistema na baseplate. ....	30
<b>Tabela 7.</b> Descrição dos materiais necessários para o controlo da temperatura de funcionamento do laser.....	31
<b>Tabela 8.</b> Descrição dos materiais necessários para o alinhamento do feixe do laser. ....	32
<b>Tabela 9.</b> Descrição dos materiais necessários para a montagem do suporte para cuvetes.....	32
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros de aquisição utilizados para a aquisição dos espectros de etanol. ....	42
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do tempo de exposição na qualidade do espectro Raman de etanol. ....	44
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do ganho na qualidade do espectro de etanol. ....	45
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do número médio de imagens na qualidade do espectro de etanol.....	46
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros de aquisição utilizados para a aquisição dos espectros de urina.....	48
<b>Tabela 15.</b> Dados utilizados para a rede de aprendizagem supervisionada.....	49
<b>Tabela 16.</b> Análise da forma como a alteração dos hiperparâmetros impacta a avaliação da rede. ...	58



# 1. Introdução

A Lesão Renal Aguda (AKI) é uma condição clínica complexa que, se não for diagnosticada e tratada precocemente, pode ter graves consequências na saúde do doente. Esta condição caracteriza-se por uma rápida deterioração da função renal, resultando na incapacidade temporária por parte dos rins de realizarem eficazmente as suas funções. A gravidade desta lesão, bem como a rapidez do seu diagnóstico e tratamento, são fatores decisivos no prognóstico da condição. Se for tratada de forma precoce e eficaz, existe a possibilidade de recuperação total ou parcial da função renal. Contudo, se o tratamento não ocorrer atempadamente, esta lesão pode transitar para uma Doença Renal Crónica (CKD). Neste estágio avançado, o paciente necessita de terapias renais substitutivas, como a diálise ou transplante renal, para manter a função renal. Terapias como estas implicam grandes constrangimentos socioeconómicos, além de uma redução significativa na qualidade de vida dos doentes. Assim, a prevenção e diagnóstico da AKI surgem como tópicos cruciais na área da saúde. [1], [2]

Atualmente, o diagnóstico da AKI passa pela medição dos níveis de creatinina no soro e do volume de urina produzida. A creatinina é uma substância produzida nos músculos, resultante do metabolismo da creatina, a sua taxa de produção é relativamente constante e é maioritariamente excretada pelos rins. Quando a função renal é comprometida, a capacidade dos rins de filtrarem e excretarem a creatinina produzida torna-se insuficiente, resultando em concentrações elevadas de creatinina no soro. A monitorização da creatinina no soro é um biomarcador com baixo desempenho na deteção da AKI, uma vez que os níveis de creatinina apenas aumentam quando o paciente perde cerca de metade da função renal basal. Quando isto acontece, a lesão já progrediu para CKD e o diagnóstico é considerado tardio. Para além disto, a concentração de creatinina oscila com o metabolismo muscular e com variações do volume extracelular, dois parâmetros muito instáveis em doentes com lesões renais. Da mesma forma, o volume de urina produzido é influenciado por diversos fatores, incluindo o volume de líquidos ingeridos ou pela utilização de medicamentos diuréticos. [3], [4], [5], [6]

A espectroscopia Raman tem vindo a emergir como uma ferramenta promissora na deteção precoce de doenças renais, permitindo compreender as mudanças químicas associadas a estas condições clínicas. A pesquisa neste campo tem avançado consideravelmente, focando-se nas capacidades únicas da espectroscopia Raman para identificar biomarcadores específicos em fluidos biológicos complexos, como a urina. [7]

A análise de urina utilizando espectroscopia Raman oferece várias vantagens em relação aos métodos convencionais. Além de eliminar a necessidade de diluição da amostra e do uso de reagentes, esta abordagem reduz o tempo de avaliação e fornece informações mais abrangentes sobre os constituintes da urina. Adicionalmente, a recolha de urina é um procedimento não invasivo, reduzindo a necessidade de procedimentos clínicos complexos. [8]

Apesar de ter inúmeras vantagens, os sistemas Raman são complexos e podem rapidamente tornar-se dispendiosos e inacessíveis. Assim, o presente projeto visa reduzir a lacuna existente no diagnóstico precoce de doenças renais, desenvolvendo e otimizando um sistema *Point of Care*, com espectroscopia Raman, inovador e de baixo custo, específico para a análise de urina.

A hipótese central que pretendemos avaliar é a possibilidade de desenvolver um sistema *Point of Care* para realizar um diagnóstico rápido, preciso e acessível de doenças renais, utilizando as características únicas da espectroscopia Raman. Caso validado, este sistema poderá contribuir significativamente para a melhoria dos resultados clínicos e redução dos custos associados ao tratamento de complicações de doenças renais. De igual forma, poderá tornar o diagnóstico destas condições mais acessível e portátil, adequado para utilização tanto em ambientes clínicos como em emergências, onde as análises laboratoriais complexas são inexecutáveis.

## 1.1. Motivação

O desenvolvimento de tecnologias inovadoras para a detecção precoce e monitorização de doenças é uma prioridade na área da saúde. A espectroscopia Raman tem-se destacado como uma técnica promissora na área médica, devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a composição molecular de amostras biológicas complexas.

A análise de urina é uma metodologia amplamente utilizada para o diagnóstico de variadas condições de saúde, incluindo doenças renais. No entanto, os métodos tradicionais para detecção destas doenças apresentam limitações em termos de sensibilidade, especificidade e rapidez. Neste contexto, a utilização de uma tecnologia inovadora como a Espectroscopia Raman para a análise de urina tem emergido como uma potencial solução para superar estas barreiras.

O desenvolvimento de um sensor baseado em Espectroscopia Raman para a detecção de biomarcadores específicos em amostras de urina oferece várias vantagens. Devido à sua natureza não destrutiva esta técnica permite a preservação da amostra para possíveis análises subsequentes. Além disto, esta técnica possibilita a análise de amostras sem preparação prévia, tornando-se fácil de utilizar em diversos contextos. A espectroscopia Raman proporciona uma alta resolução molecular, sendo capaz de identificar de uma forma precisa e com alta sensibilidade os compostos químicos presentes na urina. Na ótica de detecção de doenças renais, a sua elevada resolução e sensibilidade demonstram-se bastante úteis, uma vez que, geralmente, estas doenças envolvem alterações subtis na composição da urina.

A motivação na realização deste estudo fundamenta-se, assim, na necessidade de melhorar os métodos de diagnóstico das doenças renais. Estas doenças afetam milhões de pessoas em todo o mundo e resultam frequentemente em complicações severas, se não forem tratadas precocemente. Para além disto, há também necessidade de tornar os métodos de detecção mais simples e portáteis, possibilitando o diagnóstico clínico em qualquer contexto. Um sistema Raman eficiente e preciso pode alterar o rumo do diagnóstico clínico, oferecendo uma ferramenta rápida, confiável e não invasiva para a detecção de doenças renais.

Como estudante de Engenharia Química e Biológica, que posteriormente alterou o seu percurso para Engenharia Biomédica, a forma como o nosso organismo reage e se adapta às doenças sempre me despertou interesse. Em particular, a análise das alterações químicas decorrentes destas disfunções é, na minha ótica, uma área de alta relevância e importância. Adicionalmente, sempre fui curiosa quanto à forma como a luz interage com os materiais e às inúmeras informações que podemos obter apenas analisando esta interação. Desta forma, a realização deste projeto vai permitir aliar estas duas vertentes, desenvolvendo e otimizando uma técnica de espectroscopia inovadora.

## 1.2. Objetivo

O objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de um sistema *Point of Care*, denominado por sistema LUMINA. Este sistema será dotado de um sensor baseado na espectroscopia Raman, projetado para ser uma ferramenta de diagnóstico rápida, capaz de detetar alterações moleculares na urina e biomarcadores que indicam a presença de patologias renais. Esta abordagem deve atender aos critérios de portabilidade e de baixo custo. Futuramente, serão introduzidos neste sistema outras duas técnicas para a análise de urina, formando um sistema optoeletrónico portátil trifásico, com o propósito de determinar o estado de saúde renal do paciente. Os parâmetros propostos a serem medidos pelo sistema LUMINA são a cor e a turbidez da amostra de urina, a fluorescência induzida por UV e o espectro Raman obtido. Este sistema irá determinar todos estes parâmetros apenas numa análise. Na presente dissertação, vamos focar-nos no desenvolvimento e otimização da espectroscopia Raman.

Para validar a parte da espectroscopia Raman, iremos realizar a aquisição de espectros de urina com o equipamento desenvolvido.

Adicionalmente, temos a intenção de desenvolver e treinar um algoritmo de aprendizagem supervisionada para analisar os espectros Raman obtidos. Numa fase inicial, a rede de aprendizagem supervisionada será treinada com soluções de álcool, de forma a ajustar os seus parâmetros e otimizar o desempenho do algoritmo na análise espectral. Futuramente, a rede poderá ser aplicada a espectros de urina com objetivo de auxiliar o diagnóstico e simplificar a interpretação dos resultados.

De seguida, apresentamos uma lista numerada dos principais objetivos da presente dissertação:

- 1º. Montagem e alinhamento do sistema Raman;
- 2º. Otimização do sistema Raman;
- 3º. Validação do sistema Raman no contexto da análise de espectros de urina;
- 4º. Desenvolvimento e treino de um algoritmo de aprendizagem supervisionada para análise de espectros Raman.

### **1.3. Organização da dissertação**

O presente documento encontra-se estruturado em 7 capítulos que, de forma abrangente, contemplam os fundamentos teóricos, as metodologias seguidas e os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desta dissertação.

No Capítulo 1 encontra-se uma breve introdução ao projeto, na qual o leitor é contextualizado acerca dos assuntos que irão ser abordados, assim como a motivação que fundamentou o desenvolvimento do projeto, os principais objetivos e as contribuições do mesmo.

O Capítulo 2 compreende a revisão bibliográfica na qual esta dissertação se baseia, abordando os conceitos chave e princípios essenciais para a total compreensão do trabalho desenvolvido.

No Capítulo 3 é descrita a metodologia adotada para o desenvolvimento do sistema LUMINA, focado apenas na parte da espectroscopia Raman. Ao longo deste capítulo são delineados os principais componentes do sistema, os procedimentos seguidos para a sua montagem, alinhamento e calibração, e, ainda, os métodos de otimização do sistema.

No Capítulo 4 realizamos uma breve validação do sistema Raman, com 2 objetivos principais: avaliar a sua capacidade de adquirir espectros de urina de forma precisa e consistente e analisar o seu potencial para detetar variações de concentrações dos compostos presentes neste biofluido.

O Capítulo 5 descreve o processo de desenvolvimento da rede de aprendizagem supervisionada, incluindo a descrição das várias etapas que foram seguidas e do processo de otimização da rede.

O Capítulo 6 engloba a discussão de todos os resultados obtidos, assim como a indicação dos métodos ou componentes que otimizam o sistema desenvolvido.

No Capítulo 7 são apresentadas as conclusões finais do presente projeto, elaboradas como resposta aos objetivos propostos no Capítulo 1. Neste capítulo também são elaboradas considerações objetivas acerca do projeto realizado, assim como perspectivas de trabalhos futuros.

Por último, no final deste documento são descritas todas as referências bibliográficas consultadas para a elaboração deste projeto e um capítulo adicional onde se encontram os anexos.

### **1.4. Contribuições da dissertação**

Esta dissertação está enquadrada no projeto LUMINA (*Light Based Urine Monitoring and Analysis*), financiado pelo programa do IPL IDI&CA 2023, que tem como objetivo central conceber e desenvolver um dispositivo portátil, utilizando a tecnologia Raman e UV, para a deteção de doenças renais. Todas as atividades experimentais serão conduzidas nos laboratórios CTS-ISEL e no laboratório de Farmacologia Renal, Cardiovascular e Metabólica do iNOVA4Health, na NOVA Medical School da Universidade NOVA de Lisboa.

### **1.5. Divulgação científica**

No âmbito da presente dissertação resultou a publicação do seguinte artigo:

- A. Fantoni, M. Fernandes, J. Fidalgo, K. Soto, S. A. Pereira, A. Moreno, C. Domingos, A. Correia, H. Sousa, C. Serafinelli, M. Vieira, "The LUMINA setup for a light-based urine monitoring and analysis", Proc. SPIE, Biophotonics in Point-of-Care III, 130080H, 2024. <https://doi.org/10.1117/12.3022182>.

Posteriormente, será publicado um outro artigo, no qual serão expostos os principais resultados e conclusões do presente trabalho.

## 2. Estado de Arte

### 2.1. Interação da radiação eletromagnética com a matéria

Um feixe de radiação magnética, ou simplesmente um feixe de luz, é composto por pequenas partículas de energia, denominadas por fótons. A interação da luz com a matéria resulta em diversos fenômenos físicos, que dependem, na sua maioria, da energia dos fótons que compõem a radiação. Quando estes fótons incidem numa molécula podem ser absorvidos, dispersados ou atravessar a molécula, sem interagir com a mesma. [9]

O fenômeno de absorção ocorre quando a energia do fóton incidente é igual ou superior à diferença energética entre o estado fundamental e um estado excitado da molécula. Nestes casos, o fóton é absorvido pela molécula e a sua energia é transferida para um elétron, com este aumento energético o elétron é promovido para um estado de maior energia. Este processo é amplamente utilizado em várias técnicas de espectroscopia, como a espectroscopia de Infravermelhos, uma vez que tem a capacidade de fornecer informações valiosas sobre as transições eletrônicas das moléculas. [9]

Quando o fóton não possui energia suficiente para promover um elétron a um estado energético superior, interage com a molécula, mas é rapidamente dispersado. Esta interação provoca a polarização da nuvem eletrônica ao redor dos núcleos atômicos da molécula, elevando temporariamente o seu estado energético. Durante esta interação, forma-se um complexo instável e transitório entre a energia da radiação incidente e os elétrons da molécula, alterando momentaneamente a sua geometria eletrônica, sem causar alterações significativas nos núcleos atômicos. Este estado transitório e hipotético é conhecido como “estado virtual”, no qual a molécula absorve temporariamente um fóton da radiação incidente. A energia deste estado intermédio depende da frequência da radiação que incide na molécula. Devido à instabilidade e breve duração deste estado virtual, o fóton absorvido é rapidamente reemitido pela molécula como radiação dispersa. [9]

A radiação dispersada pela molécula pode ser categorizada em dois tipos principais: dispersão de Rayleigh e dispersão de Raman. A dispersão de Rayleigh ocorre quando o fóton disperso resulta da transição do elétron do estado virtual de volta para o seu estado fundamental, ou seja, o fóton disperso mantém a frequência do fóton incidente. Este fenômeno é considerado uma dispersão elástica, na qual não ocorre a absorção ou perda de energia pelas moléculas, não havendo trocas de energia entre o feixe de radiação e o material. A dispersão de Rayleigh é o processo de dispersão dominante. Por outro lado, na dispersão de Raman o feixe disperso apresenta frequências superiores (Stokes) ou inferiores (Anti-Stokes) em relação ao feixe de radiação incidente. Este fenômeno conhecido como dispersão inelástica, é o processo menos provável de ocorrer, ocorrendo em apenas um fóton em cada milhão. O fóton Raman disperso resulta da transição do elétron do estado virtual para um estado vibracional diferente do fóton incidente. Como existe alteração da energia dos fótons dispersos, e devido à conservação global da energia, o diferencial de energia é absorvido ou libertado pelo material. A diferença entre as frequências dos fótons antes e depois da interação com a amostra é denominada por *Raman Shift*. Estes desvios correspondem às frequências vibracionais das ligações moleculares e fornecem informações cruciais e detalhadas quanto às ligações e estruturas moleculares presentes na amostra. [9], [10], [11]

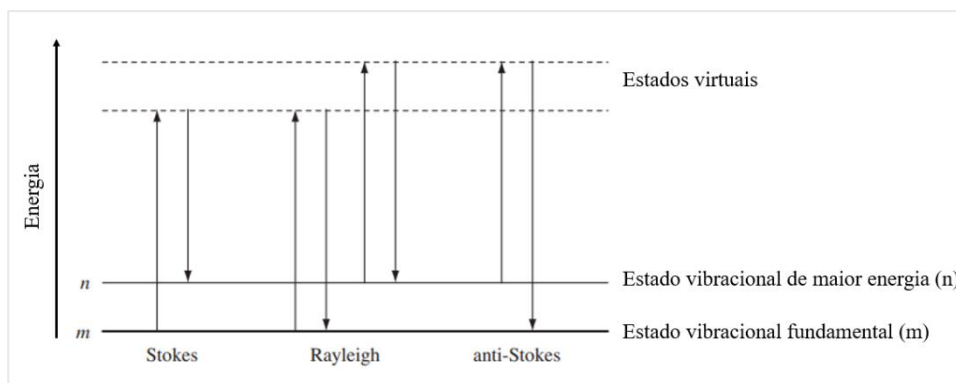


Figura 1. Diagrama dos processos de dispersão Rayleigh e Raman (Stokes e Anti-Stokes), adaptado de [12].

## 2.2. Espetroscopia Raman

A dispersão de Raman tem este nome devido a Chandrasekhara Venkata Raman, um importante físico e professor reconhecido pelas suas significativas contribuições em diversas áreas, destacando-se no campo da ótica. O seu estudo acerca da dispersão da luz culminou na descoberta deste tipo de dispersão e do efeito de Raman, em 1928, tendo-lhe sido atribuído o Prémio Nobel da Física dois anos depois, como forma de reconhecimento do seu feito. [13]

Na experiência que deu origem à descoberta da dispersão Raman, conduzida por C.V. Raman em colaboração com K.S. Krishnan, um feixe de luz solar foi focalizado sucessivamente através da objetiva de um telescópio e de uma segunda lente, até alcançar a amostra líquida. Utilizando filtros óticos, conseguiram demonstrar visivelmente a existência de uma radiação secundária, de intensidade inferior à dispersão de Rayleigh, cuja frequência diferia em relação à luz incidente. Este fenómeno foi observado em cerca de 60 amostras de diferentes líquidos e foi denotado que o espectro resultante, denominado como espectro Raman, variava conforme a composição química das amostras. Esta descoberta desencadeou uma compreensão mais ampla da interação entre a luz e a matéria, bem como da influência da composição molecular da amostra sobre tal interação. [14], [15]

Inicialmente, a espectroscopia Raman não foi tão aplicada quanto era esperado, devido a vários desafios tanto a nível técnico como operacional. A complexidade da técnica, o custo elevado dos equipamentos e os problemas instrumentais limitaram a sua aceitação e aplicação. Além disso, a interferência da fluorescência e o risco de degradação da amostra também eram fatores que contribuíam para a baixa utilização desta técnica. [10]

No entanto, os avanços significativos na instrumentação resolveram grande parte destes desafios, tornando os espectrómetros Raman mais simples, pequenos e portáteis. A descoberta dos lasers, em 1960, tornou-se um marco significativo na espectroscopia Raman. Com a invenção do laser de rubi, passou a existir uma fonte de radiação monocromática coerente e intensa, ideal para a deteção eficaz dos sinais Raman, tipicamente fracos. O desenvolvimento dos lasers e outras fontes de radiação tornam a espectroscopia Raman mais sensível, minimizando os problemas de fluorescência e melhorando a qualidade dos espectros obtidos, impulsionando assim a sua utilização na comunidade científica. De igual modo, o desenvolvimento dos detetores e a otimização do sistema ótico da instrumentação desempenharam papéis fundamentais no aprimoramento da resolução, da eficiência e na redução dos custos associados à técnica. Mais recentemente, o desenvolvimento de novos métodos de processamento dos dados espectrais contribuiu de igual forma para o aumento da aplicação da técnica. Avanços em algoritmos de análise de dados, técnicas de minimização de ruído e identificação de padrões, através de métodos de aprendizagem automática, tem vindo a tornar a interpretação dos espectros Raman cada vez mais rápida e precisa. [9], [10], [16]

A espectroscopia Raman baseia-se, assim, na deteção da dispersão inelástica da luz. Durante uma análise com esta tecnologia, um feixe de radiação monocromática incide sobre a amostra. Desta

interação resulta a dispersão de radiação por parte da amostra, na qual uma pequena fração corresponde à radiação inelástica. A radiação dispersada pela amostra passa por um conjunto de filtros que isolam a radiação Raman, garantindo a remoção da radiação de Rayleigh. A radiação é captada por um detector, responsável por medir e registrar a sua intensidade. Este detector converte a luz recolhida num sinal elétrico que pode ser processado e analisado. O *output* obtido é uma representação gráfica da intensidade da radiação dispersa em função do *Raman Shift*, medido em números de onda, expressos, geralmente, em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ . Este deslocamento Raman representa a diferença de energia entre a luz incidente e a luz Raman dispersa pela amostra. A intensidade da radiação dispersa é proporcional ao número de fótons captados pelo detector, podendo ser expressa em unidades arbitrárias (u.a.) ou em contagens por segundo. [11], [17]

À semelhança da espectroscopia de Infravermelhos, a espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional. Estas técnicas são amplamente utilizadas com o objetivo de obter informações detalhadas acerca da estrutura molecular, da composição e das ligações químicas que compõem uma amostra. Em particular, a espectroscopia Raman tem a capacidade de fornecer “impressões digitais” moleculares únicas através da análise das vibrações moleculares dos compostos, permitindo a caracterização e identificação precisa de um vasto conjunto de substâncias. [9], [16]

A eficácia da espectroscopia Raman é fortemente influenciada pela qualidade da fonte de radiação utilizada. A energia da radiação Raman dispersa é muito fraca e dificilmente detetável sem uma fonte de radiação com potência elevada. Para obtermos um espectro que permita a identificação precisa das vibrações moleculares, a fonte de radiação tem de ser o mais monocromática possível e possuir alta coerência e estabilidade. [16]

A intensidade da dispersão Raman de um composto é dada pela seguinte equação: [9], [16]

**Equação 1.** Intensidade da dispersão Raman.

$$I_{Raman} = KI\alpha^2w^4$$

O parâmetro  $K$  é constante dependente da instrumentação utilizada,  $I$  é a potência da fonte de radiação utilizada, o parâmetro  $\alpha$  consiste na polarizabilidade dos eletrões da molécula analisada e, por último, o parâmetro  $w$  corresponde à frequência da fonte de radiação. Posto isto, o parâmetro que mais impacta a intensidade Raman, e que está ao alcance de ser alterado, é a frequência da radiação incidente. Quanto maior for a frequência da radiação utilizada, mais a intensidade de radiação Raman dispersa pela amostra. A frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda da radiação, ou seja, comprimentos de onda menores aumentam a intensidade da radiação Raman. [9], [16]

Os lasers são considerados a fonte de radiação ideal para a espectroscopia Raman. O feixe de luz emitido pelo laser é altamente colimado e direcional, com elevada coerência espacial e temporal. A coerência é um parâmetro fundamental para garantir a resolução espectral da técnica, a padronização dos ensaios e facilitar a eliminação de ruído. É necessário ser crítico na seleção do comprimento de onda utilizado para a análise da amostra, considerando a **Equação 1** e potenciais efeitos de fluorescência. Adicionalmente, os lasers possuem um diâmetro de feixe pequeno, o que facilita a sua convergência na amostra. [9], [10], [18]

A fluorescência emitida pela amostra, ou pelas impurezas que esta possa conter, é um dos aspetos que requer particular atenção na espectroscopia Raman. Se o material analisado interagir com a radiação incidente e emitir radiação em forma de fluorescência, as bandas associadas a esta fluorescência podem interferir com o espectro Raman. Estas bandas de fluorescência são consideravelmente mais intensas do que as bandas associadas ao sinal Raman, contaminando assim o espectro obtido e dificultando a deteção dos picos Raman. Para minimizar a interferência da fluorescência, deve ser efetuado um estudo preliminar com o objetivo de determinar os comprimentos de onda nos quais a amostra emite a menor fluorescência possível. Este estudo envolve a análise da resposta da amostra quando atingida por

diferentes comprimentos de onda, de forma a identificar uma região espectral onde a fluorescência é mínima. Com base nestes resultados, conseguimos selecionar o comprimento de onda mais adequado para a análise Raman. Para além disso, no caso de a fluorescência ter origem nas impurezas da amostra, é essencial realizar um pré-tratamento para as eliminar de modo a não interferirem com o espectro da amostra. [10]

Devido à fraca intensidade do sinal Raman, um dos principais desafios desta técnica é a deteção adequada do sinal e a obtenção de picos analisáveis. O sistema Raman, como um todo, tem de ser capaz de eliminar a forte radiação de Rayleigh e, ao mesmo tempo, amplificar a fraca radiação Raman dispersa pela amostra. Para isto acontecer, o feixe de radiação deve estar devidamente focado na amostra e o máximo de radiação dispersa deverá ser recolhida de forma eficaz. [10], [11]

### **2.3. Aplicação da Espectroscopia Raman na área da biomédica**

Devido aos recentes avanços na instrumentação, a espectroscopia de Raman tem-se tornado uma ferramenta cada vez mais valiosa e abrangente. Atualmente, esta técnica destaca-se por não exigir nenhuma preparação prévia das amostras; por ser uma técnica compatível com amostras complexas e aquosas, uma vez que o sinal de Raman produzido pela água é relativamente fraco, não interferindo com o sinal dos restantes componentes; e devido à sua natureza não destrutiva, podendo ser utilizada como técnica de diagnóstico e para medições *in situ*. Com o surgimento de técnicas como a microscopia Raman tornou-se ainda possível a análise de pequenas quantidades de materiais com alta resolução espacial. [7]

Desta forma, a espectroscopia de Raman permite uma completa caracterização de amostras, incluindo matrizes biológicas complexas, consolidando assim o papel relevante desta tecnologia em áreas como a biomédica.

A análise de biofluidos como o plasma, o soro e a urina, através da espectroscopia de Raman representa um método de diagnóstico minimamente invasivo, capaz de fornecer importantes informações acerca do estado de saúde do paciente. Contudo, a aplicação da espectroscopia Raman a estes biofluidos é limitada devido às concentrações relativamente baixas de biomoléculas, em contraste com tecidos e células. Além disso, especialmente na análise da urina, uma restrição adicional consiste na variabilidade da sua composição, altamente influenciada pela dieta e estilo de vida do paciente, podendo contribuir para gerar conclusões incorretas. [7]

A análise de urina utilizando espectroscopia Raman oferece várias vantagens em relação aos métodos convencionais na deteção de doenças renais. Além de eliminar a necessidade de diluição da amostra e do uso de reagentes, esta abordagem reduz ainda o tempo necessário para a avaliação. Adicionalmente, fornece informações mais abrangentes sobre os constituintes da urina, possibilitando a deteção precoce dos marcadores moleculares associados às doenças renais, tudo isto utilizando apenas uma pequena quantidade de amostra. [8]

A urina apresenta uma matriz particularmente complexa, refletindo-se num espectro Raman igualmente complexo e rico em informações. Por esta razão, é crucial conhecer as doenças e identificar os principais biomarcadores associados às mesmas.

## 2.4. Doenças Renais

Os rins são órgãos vitais, constituintes do sistema urinário, que desempenham um papel crucial no funcionamento do organismo humano. A cada minuto, mais de um litro de sangue, proveniente da circulação sistêmica, passa pelos rins. Este sangue é filtrado e purificado por milhões de unidades funcionais presentes nos rins, denominadas por nefrônios. Durante este processo, são eliminadas substâncias tóxicas, como resíduos metabólicos, nomeadamente, a ureia e a creatinina, e excesso de água, purificando o sangue antes deste regressar à corrente sanguínea. Estes são órgãos essenciais para assegurar a homeostase dos fluidos corporais, uma vez que mantêm o equilíbrio ácido-base e regulam a composição de água e eletrólitos, em especial o sódio e potássio. Além disso, possuem importantes funções endócrinas, produzindo hormonas, como a eritropoietina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos, enzimas, que controlam a pressão arterial, e produzindo metabolitos ativadores de vitamina D. [1], [19]

A filtração glomerular é uma das muitas funções essenciais dos rins e é quantificada pela Taxa de Filtração Glomerular (GFR), dada, geralmente, pela quantidade de sangue filtrado por minuto. A GFR é atualmente considerada a melhor medida para quantificar o estado renal geral, uma vez que a diminuição da capacidade de filtração glomerular está muitas vezes correlacionada com a perda de outras funções renais. [2], [20]

Na maioria dos casos, as patologias que afetam os rins são consideradas silenciosas, uma vez que, geralmente, não estão associadas a sintomas específicos nem alarmantes. A maior parte dos sintomas das doenças renais passam por um aumento da pressão arterial, diminuição do volume de urina produzido (diurese), sangue na urina (hematúria), cansaço, alterações do sono, dor de cabeça e dificuldades de concentração. [21]

A AKI enquadra-se no grupo de doenças funcionais que afetam os rins, denominado por Doenças e Distúrbios Renais Agudos (AKD). Esta lesão, com duração inferior a 7 dias, é caracterizada por uma rápida deterioração da função renal, resultando na incapacidade temporária por parte dos rins de realizar eficazmente as suas funções. [1], [2]

A AKI manifesta-se clinicamente por um aumento mínimo de 0,3 mg/dl dos níveis de creatinina no soro ou pelo aumento destes níveis em 1,5 vezes, num período de 48 horas, e por uma diminuição do volume da urina produzida em 6 horas, inferior a 0,5 ml/kg/h. No ponto de vista fisiopatológico, após ocorrência de um cenário de AKI, observam-se alterações significativas a nível celular e na arquitetura do tecido renal. Exemplos destas modificações são a inflamação intersticial, perda de vasos sanguíneos, fibrose e danificação da *brush border*, uma estrutura presente nas células epiteliais dos nefrônios, que desempenha um papel crucial no processo de filtração e reabsorção de substâncias. [22]

A gravidade da AKI, bem como a rapidez do seu diagnóstico e tratamento, são fatores decisivos na evolução e prognóstico desta condição. Se for tratada de forma precoce e eficaz, existe possibilidade de a arquitetura renal ser reestabelecida e regenerada, recuperando total ou parcialmente a função renal. Contudo, se o tratamento não ocorrer atempadamente, esta lesão pode transitar para uma doença crónica, na qual o doente pode ter necessidade de terapias renais substitutivas, como diálise ou transplante renal. [21], [22], [23]

A CKD é definida pela presença de alterações na função ou estrutura renal, durante um período superior a 3 meses, com repercussões negativas para a saúde do doente. Durante este período, os rins perdem gradualmente a capacidade de realizar a sua função de forma eficaz. Contrariamente à AKI, a perda de função renal é irreversível, uma vez que não ocorre regeneração dos nefrônios perdidos. Esta perda irreversível causa stress e impacta o funcionamento dos nefrônios não afetados, causando um aumento da pressão de filtração glomerular e hiperfiltração renal. [2]

A identificação da causa subjacente que levou à CKD auxilia na determinação de uma terapia, focada em atenuar os fatores de risco e diminuir a progressão da doença. Compreender os fatores que

contribuem para esta doença permite, não só desenvolver estratégias de tratamento mais eficazes, mas também melhorar a literacia em saúde dos doentes, capacitando-os a uma melhor gestão da sua condição e adoção de medidas preventivas. [2]

Do ponto de vista clínico, esta doença é diagnosticada através de um dos seguintes critérios, presentes durante um período mínimo de 3 meses: [1], [2]

- GFR < 60 ml/min por 1.73 m<sup>2</sup>;
- Índícios de um ou mais marcadores de lesão renal, como albuminúria (Rácio Albumina/Creatinina superior a 30 mg/g de creatinina), hematuria persistente, alterações patológicas ou estruturais, anomalias na sedimentação da urina ou instabilidade a nível dos eletrólitos, causado por distúrbios tubulares.

A AKI e a CKD são duas condições médicas distintas, porém fortemente relacionadas. A AKI é um fator de risco para o desenvolvimento da CKD, se não for adequadamente tratada a tempo. Da mesma forma, as pessoas com CKD têm um maior risco de desenvolver AKI, quando expostas a determinados fatores de risco, como infeções, medicamentos nefrotóxicos ou complicações pós-cirúrgicas. Ambas as condições compartilham fatores de risco que incluem idade avançada, predisposição genética, hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares e, de um modo geral, doenças crónicas inflamatórias. Para além disto, possuem implicações semelhantes, como doenças cardiovasculares, diminuição da qualidade de vida do doente e redução progressiva da função renal. [22]

A fase inicial de AKI representa uma fase crucial, durante a qual intervenções podem ser realizadas para mitigar ou impedir a progressão da lesão aguda para a doença renal crónica. Nesta fase, devem ser implementadas medidas terapêuticas e preventivas capazes de alterar o curso da lesão, minimizando o risco de complicações a longo prazo. [2]

De forma a prevenir a evolução para uma doença crónica, deve ser assegurada a deteção precoce destas patologias renais agudas, contudo, o seu diagnóstico é complexo e frequentemente tardio. Como já referido, as doenças renais agudas apresentam sintomas gerais e pouco específicos o que pode dificultar o diagnóstico precoce da condição. De modo semelhante, a maioria dos sintomas de CKD passam igualmente despercebidos pelos pacientes, até que a doença esteja num estado mais avançado, devido à mesma natureza inespecífica dos seus sintomas, tais como cansaço, dificuldade na concentração, enjoos, caíbras musculares ou falta de apetite. [21], [24]

Os níveis de creatinina no soro (sCr) e o volume de produção de urina, denominada como diurese, são marcadores habitualmente utilizados para o diagnóstico de AKI, no entanto, estes possuem limitações. A monitorização da creatinina no soro é um biomarcador com baixo desempenho na deteção de AKI, uma vez que os níveis de creatinina apenas aumentam quando cerca de metade da função renal basal é perdida. Nesta fase, a AKI já progrediu para CKD e o diagnóstico é considerado tardio. Para além disso, a concentração de creatinina oscila com o metabolismo muscular e com variações do volume extracelular, dois parâmetros muito instáveis em pessoas com AKI. Da mesma forma, a produção de urina é influenciada por diversos fatores incluindo o volume de líquidos ingeridos e a utilização de medicamentos diuréticos. Desta forma, torna-se crucial o desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico que permitam a deteção precoce de AKI, visando uma rápida intervenção, melhorando o prognóstico da condição. [3], [4], [5], [6]

O procedimento para o tratamento da AKI depende da sua causa e estágio, porém de uma forma geral inclui a suspensão imediata de fármacos nefrotóxicos, a ingestão limitada de água, sódio, potássio e fosfato, controlo da pressão arterial e monitorização da dieta do doente. Se a AKI não for eficazmente tratada, o risco de desenvolvimento de CKD aumenta consideravelmente. [19]

As metodologias predominantes utilizadas para diagnosticar CKD envolvem análises laboratoriais, como a deteção da quantidade de proteína albumina na urina (albuminúria) e o cálculo da GFR, utilizando os níveis de biomarcadores como a creatinina e a cisteína C no sangue. Podem ser utilizadas outras metodologias mais invasivas para diagnosticar CKD, como uma Ecografia ou Tomografia Axial

Computorizada (TAC), de forma a obter imagens de todo o sistema urinário e averiguar o tamanho dos rins, a presença de pedras ou tumores renais e identificar eventuais problemas na estrutura renal. Ou ainda, através da realização de uma biópsia, na qual é retirada uma pequena amostra do tecido renal, de forma a verificar a extensão e o tipo de patologia renal. [1]

Atualmente, o tratamento da CKD não permite a cura da doença, porém permite retardar a sua progressão, através de medicação e alteração do estilo de vida do paciente, prevenir doenças cardiovasculares, tratar complicações da doença e facilitar a transição para terapia renal de substituição, quando necessária. Em especial, para controlar fatores de risco, como hipertensão e diabetes, é essencial monitorar e controlar a pressão sanguínea e os níveis de açúcar no sangue. Assim, é de extrema importância identificar precocemente os doentes em estádios iniciais de AKI e grupos de risco para o desenvolvimento da doença, a fim de adotar medidas estratégicas para retardar a progressão da doença. [1], [24]

A longo prazo, a CKD afeta a maior parte dos órgãos, nomeadamente, a função pulmonar e a função cardíaca. As principais possíveis sequelas causadas pela CKD são irregularidades no ritmo cardíaco, devido ao aumento do nível de potássio no sangue; anemia, devido à diminuição da produção da hormona eritropoietina por parte dos rins; doenças ósseas, devido à incapacidade dos rins de removerem o fosfato em excesso do organismo; hipercalcemia, que se trata de falta de cálcio na corrente sanguínea, devido à falta de capacidade dos rins para ativarem eficazmente a vitamina D. Além disto, causa alterações de humor, confusão mental, náuseas e falta de apetite, originados pela acumulação de resíduos tóxicos no sangue, bem como o agravamento de outras condições de saúde, como a diabetes, hipertensão arterial ou doença hepática. [1]

Nos rins existe uma reserva enorme de unidades funcionais, chegando a existir milhões de nefrónios, assim sendo, é possível que o doente perca 50% da função renal sem qualquer evidência nem sintomas de CKD. Para além disto, os rins são órgãos com uma alta capacidade de compensação fisiológica, capazes de se adaptarem à perda de nefrónios, através da sua reserva funcional e da capacidade de aumentarem a taxa de filtração glomerular de cada nefrónio. Porém, mesmo sem sintomas, a CKD continua a progredir e a deterioração renal é ainda acelerada pela hiperfiltração glomerular (que leva à fibrose dos tecidos), causada pelo aumento da GFR de cada nefrónio. Quando há uma queda drástica no número de nefrónios funcionais, os mecanismos de adaptação do organismo deixam de ser suficientes e há progressão para o estágio de doença renal terminal (ESRD). Na ESRD, a sobrevivência do doente só pode ser sustentada através de diálise peritoneal, hemodiálise ou de um transplante renal. A diálise peritoneal e a hemodiálise são terapias a longo prazo e permanentes, que assumem a função dos rins, eliminando os resíduos tóxicos e o excesso de líquidos do sangue. [1], [20]

Com o aumento dos casos de doenças renais agudas e crónicas, torna-se essencial prever a incidência destas doenças e assegurar que os pacientes de risco estão informados e são regularmente monitorizados por profissionais de saúde. Devido à natureza frequentemente assintomática da AKI e CKD, a testagem regular de pacientes de risco é único método eficaz para a deteção destas doenças em estádios iniciais. A deteção precoce possibilita a implementação de intervenções terapêuticas capazes de retardar a progressão da doença, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir a incidência de complicações graves. [2]

## 2.5. Abordagem Raman para detecção de doenças renais

A espectroscopia Raman tem-se destacado como uma técnica conveniente e relevante para a análise de fluidos biológicos complexos, como a urina. A sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a composição molecular de uma amostra torna-a especialmente útil para o diagnóstico de diversas patologias, incluindo doenças renais. O espectro Raman da urina contém informações importantes acerca da sua composição, que podem ser correlacionadas com a presença de biomarcadores indicativos de patologias renais. Iremos apresentar uma breve revisão de estudos desta área.

Premasiri et al. analisaram amostras de urina, utilizando espectroscopia Raman convencional e amplificada por superfície (SERS), de forma a detetar biomarcadores, como a creatinina, ureia e ácido úrico. A ureia é o principal componente com azoto presente na urina, evidenciando um pico intenso em torno de  $1000\text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman, correspondente ao alongamento simétrico da ligação C-N. Já para a detecção de creatinina e ácido úrico, utilizaram a SERS, amplificando o sinal destes biomarcadores, considerando as suas menores concentrações na urina. Identificaram um pico intenso a cerca de  $600\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente proveniente das vibrações moleculares do anel e da ligação dupla C=O da creatinina, e picos a  $464$ ,  $783$  e  $1745\text{ cm}^{-1}$  típicos do ácido úrico. Os autores concluíram que a combinação da técnica Raman convencional com a SERS é uma opção prática e valiosa para a detecção de compostos nitrogenados na urina. [25]

J. W. McMurdy e A. J. Berger realizaram um dos primeiros estudos de quantificação da concentração de creatinina na urina, através de espectroscopia Raman convencional. Os resultados obtidos foram limitados, uma vez que a amostra populacional utilizada foi de apenas 19 pacientes. Porém, a modelação das variações dos pacientes foi adequada, abrindo possibilidades para a quantificação de outros compostos em amostras de urina. [26]

O estudo conduzido por J. A. M. Bispo e colaboradores analisou amostras de urina provenientes de pessoas com diabetes e hipertensão arterial, com e sem complicações renais. Estabeleceram a correlação entre as concentrações de ureia, creatinina e glucose com o risco associado à insuficiência renal. Ao analisar os espectros Raman obtidos, relataram uma diminuição progressiva nas concentrações de creatinina e ureia e um aumento na concentração de glucose, que se associava ao agravamento da condição renal. [27]

A utilidade das medições de urina baseadas na SERS foi investigada para a detecção precoce de rejeição aguda em 58 pacientes pós-transplante renal. Ao examinar os espectros de urina, observou-se que todos os pacientes que desenvolveram AKI exibiram picos distintos em  $1360\text{ cm}^{-1}$ , enquanto nos restantes pacientes este pico estava ausente ou tinha uma baixa intensidade. A principal suposição para essa característica é a presença do grupo *heme* livre, que pode estar correlacionada com o risco elevado de AKI. [28]

Entre junho de 2014 e julho de 2017, M. J. Jeng e colaboradores conduziram um estudo onde analisaram 200 amostras de urina, provenientes de pacientes da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), sendo que o grupo controlo era composto por 120 pessoas que não tinham AKI e o grupo de estudo 80 indivíduos com diagnóstico de AKI em diferentes estágios. A análise espectral revelou picos de ureia, creatinina, hidroxibutirato e ácido úrico mais proeminentes nos espectros dos pacientes sem lesão, apesar da pouca diferença entre grupos, possivelmente, devido à predominância de AKI no primeiro estágio da lesão e à dimensão reduzida da amostra em estudo. [8]

Adicionalmente, outros biomarcadores urinários de importância equivalente, têm sido identificados por diferentes tecnologias como ELISA, *Western Blotting* e análises proteómicas. Os biomarcadores mais promissores descritos na literatura são o NGAL, IL-18 e Cistatina C. [29]

A Lidocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) é uma proteína excretada pelas células epiteliais de vários órgãos, incluindo dos rins. Em indivíduos saudáveis, os níveis de NGAL na urina e no soro são baixos, no entanto, após uma lesão renal, observa-se um aumento significativo dos seus

níveis. Estudos pré-clínicos do perfil de transcrito em animais identificaram a NGAL como uma das proteínas excretadas precocemente em resposta a uma lesão renal. Resultados similares foram obtidos em análises proteômicas e de *Western Blotting*, evidenciando que a NGAL é a proteína mais abundantemente produzida após um episódio de AKI, induzida por isquemia ou agentes nefrotóxicos em animais. Estas descobertas deram origem a novos estudos para avaliar a utilização da NGAL como um biomarcador não invasivo na detecção clínica de doenças renais. [30], [31], [32], [33]

Em 2005, K. Mori e colaboradores conduziram um estudo transversal envolvendo adultos saudáveis e diagnosticados com lesão renal, com o propósito de demonstrar as variações do nível da proteína NGAL entre estes grupos. O estudo evidenciou um aumento significativo nos níveis de NGAL, atingindo até 100 vezes mais concentração na urina e 10 vezes mais no soro, através de análises de *Western Blotting*, quando comparados com os grupos de controle, sem a condição renal. Estes resultados identificaram a NGAL como uma resposta sensível à AKI estabelecida em humanos. [34]

A interleucina IL-18 é uma proteína sinalizadora essencial na regulação do sistema imunológico. Esta proteína desempenha um importante papel na resposta inflamatória e ativação das células do sistema imunológico, sendo sintetizada em diversos tecidos, inclusive no túbulo proximal renal. Estudos em animais demonstraram que esta citocina é produzida e ativada em casos de AKI isquêmica, podendo ser facilmente detetada na urina. Outros estudos em humanos demonstraram que a IL-18 é altamente sensível e específica no diagnóstico de AKI estabelecida. Os níveis desta citocina aumentaram significativamente no grupo de pessoas com diagnóstico de AKI, enquanto em doentes com CKD, infecções do trato urinário ou insuficiência renal os níveis desta proteína na urina permaneceram inalterados. [23], [29], [35], [36], [37]

Apesar destas descobertas é importante destacar que a IL-18 é libertada tanto na região tubular dos rins, como por macrófagos e monócitos sanguíneos e depois filtrada nos rins e eliminada na urina. Por conseguinte, o aumento dos níveis desta interleucina pode não estar diretamente ligado à existência de AKI. Desta forma, a combinação de biomarcadores representa uma vantagem significativa para garantir um diagnóstico preciso. [38]

Por fim, a cistatina C é um inibidor de protease de cisteína sintetizado por todas as células nucleadas, sendo libertada na corrente sanguínea a uma taxa relativamente constante. Ao alcançar os rins, é filtrada pelos glomérulos e completamente reabsorvida pelo túbulo proximal. Em situações de comprometimento da função renal, concentrações de cistatina C podem ser detetadas na urina, devido ao declínio da capacidade de reabsorção renal. Uma das principais vantagens da utilização deste biomarcador, comparativamente à creatinina, é a sua invariabilidade em relação a fatores como o sexo, idade, raça ou massa muscular. [29], [39]

Em 2008, J. L. Koyner e colaboradores analisaram amostras de urina e de soro através de ensaios de ELISA, com o objetivo de avaliar a utilidade da cistatina C como biomarcador precoce de AKI na população adulta após cirurgia cardiotorácica. Observaram um aumento significativo na eliminação urinária de cistatina C após a cirurgia, associada ao desenvolvimento e gravidade da lesão renal aguda. [40]

Posto isto, aliar a espectroscopia Raman para a detecção destes biomarcadores específicos na urina pode criar oportunidades para o diagnóstico de doenças renais. Esta abordagem tem o potencial de tornar o diagnóstico mais rápido, acessível e preciso, facilitando intervenções precoces. Com a otimização de sistemas baseados em espectroscopia Raman de baixo custo, esta técnica poderá tornar-se uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de doenças renais fora de ambientes clínicos.

## 2.6. Modelo de Aprendizagem Supervisionada

A aprendizagem automática é um campo da inteligência artificial (AI) que se foca no desenvolvimento de algoritmos capazes de detetar padrões complexos a partir de dados fornecidos, fazendo previsões e aprendendo a tomar decisões precisas. Os modelos de *Machine Learning* (ML), termo em inglês para aprendizagem automática, são treinados utilizando uma grande quantidade de dados, usados pela rede para desenvolver o seu método de classificação final. Os problemas de ML podem ser classificados em duas categorias: aprendizagem não supervisionada e aprendizagem supervisionada. [41]

Na aprendizagem automática não supervisionada, os dados de entrada fornecidos à rede não são rotulados e o objetivo da rede é identificar padrões ou categorias dentro dos dados, sem terem conhecimento prévio das saídas desejadas. Este tipo de aprendizagem é muito útil em situações onde a classificação dos dados não é possível ou é difícil definir. [42]

Por outro lado, a aprendizagem automática supervisionada consiste em treinar a rede com dados rotulados, ou seja, dados que possuem saídas conhecidas ou que pertencem a classes previamente definidas. Neste tipo de algoritmos, é introduzido um vetor de entrada rotulado e a rede calcula o *output* previsto desse vetor. Este *output* é comparado com o valor real e a diferença entre estes dois valores é definido como a função de perda. O valor desta função, que é medida do erro da previsão da rede, é utilizado pelo algoritmo para atualização dos pesos de cada parâmetro de entrada. Estes ajustes são efetuados com o objetivo de minimizar o erro e otimizar a precisão das previsões da rede. Este processo de treino é repetido em várias iterações, até que os valores previstos se aproximem dos valores reais, com o menor erro possível. Ao modelo deve ser fornecido um grande número de dados de treino, uma vez que é através destes exemplos que a rede irá inferir padrões de reconhecimento e classificação. Quanto mais exemplos forem fornecidos ao modelo, mais este consegue detetar padrões e aumentar a sua precisão. [43]

A aprendizagem supervisionada é, geralmente, utilizada para resolver dois tipos de problemas: problemas de regressão e de classificação. A regressão é aplicada para prever dados numéricos, utilizando variáveis contínuas (numéricas). Nos problemas de regressão, o objetivo é encontrar a relação linear entre a variável contínua dependente e a variável independente, através de modelos matemáticos. Esta relação é geralmente dada pela equação da reta ajustada aos dados. [42]

Por sua vez, os modelos de classificação são utilizados na presença de variáveis categóricas, onde o objetivo é realizar a triagem dos dados em categorias previamente definidas. Desta forma, a classificação consiste em prever a que categoria pertence cada dado de entrada. [42]

As redes neuronais são uma poderosa ferramenta baseada na aprendizagem supervisionada, utilizada para resolver problemas de classificação. O funcionamento das redes neuronais é inspirado no cérebro humano e consiste numa estrutura composta por um elevado número de neurónios artificiais que comunicam entre si. No cérebro, os neurónios recebem estímulos de outros neurónios através das dendrites. Estes estímulos são processados no corpo celular e é gerada uma resposta, que é transportada ao longo do axónio até à região da sinapse, onde a informação é transferida para as dendrites no neurónio seguinte. As redes neuronais são simplificações baseadas neste processo biológico, simulando o fluxo de informação através das várias camadas de neurónios artificiais interconetados. [44]

Cada neurónio artificial recebe múltiplos sinais de entrada, que são combinados de forma a produzir uma única saída. Cada sinal de entrada está associado a um peso, que determina a influência desta entrada na função calculada nesse neurónio. Estes pesos podem ser vistos como a importância de cada parâmetro de entrada, sendo que parâmetros com maior peso contribuem de forma mais significativa para o valor de saída. Durante o treino supervisionado, os pesos de cada parâmetro de entrada são ajustados iterativamente de forma a minimizar a diferença entre as previsões da rede e os valores reais conhecidos. [44]

As redes neuronais podem ser configuradas em várias arquiteturas que variam de acordo com a necessidade e com os requisitos de processamento dos dados. As redes neuronais simples são constituídas apenas por uma camada de neurónios artificiais, na qual o conjunto de entradas é diretamente mapeado para a saída, utilizando uma variação de uma função linear, também conhecida como função de ativação. Este tipo de rede é a unidade elementar das redes neuronais e é geralmente conhecida como perceptrão. Por outro lado, redes mais complexas, denominadas por redes multicamada, são compostas por várias camadas com diferentes funções. Este tipo de arquitetura permite determinar padrões mais complexos e não lineares num maior conjunto de dados. Entre a camada de entrada e a camada de saída, as redes neuronais complexas possuem camadas intermédias adicionais, denominadas por camadas ocultas, uma vez que os cálculos efetuados não são visíveis ao utilizador. A camada de entrada recebe os dados de entrada e é responsável por transmiti-los às camadas subsequentes, sendo que os dados de entrada podem ser valores numéricos ou pixéis de uma imagem. As camadas ocultas têm como função processar toda a informação recebida. Quantas mais camadas ocultas a rede tiver mais profunda esta se torna e maior é a sua capacidade de captar padrões nos dados. Cada camada oculta aplica transformações aos dados, extraindo assim características e padrões relevantes. Por último, a camada de saída produz as previsões ou respostas finais da classificação dos dados, sendo que o número de neurónios nesta camada corresponde ao número de classes ou saídas possíveis na tarefa de classificação. Isto é, número de neurónios na camada de saída corresponde ao número de classes a serem previstas pela rede. [42], [44]

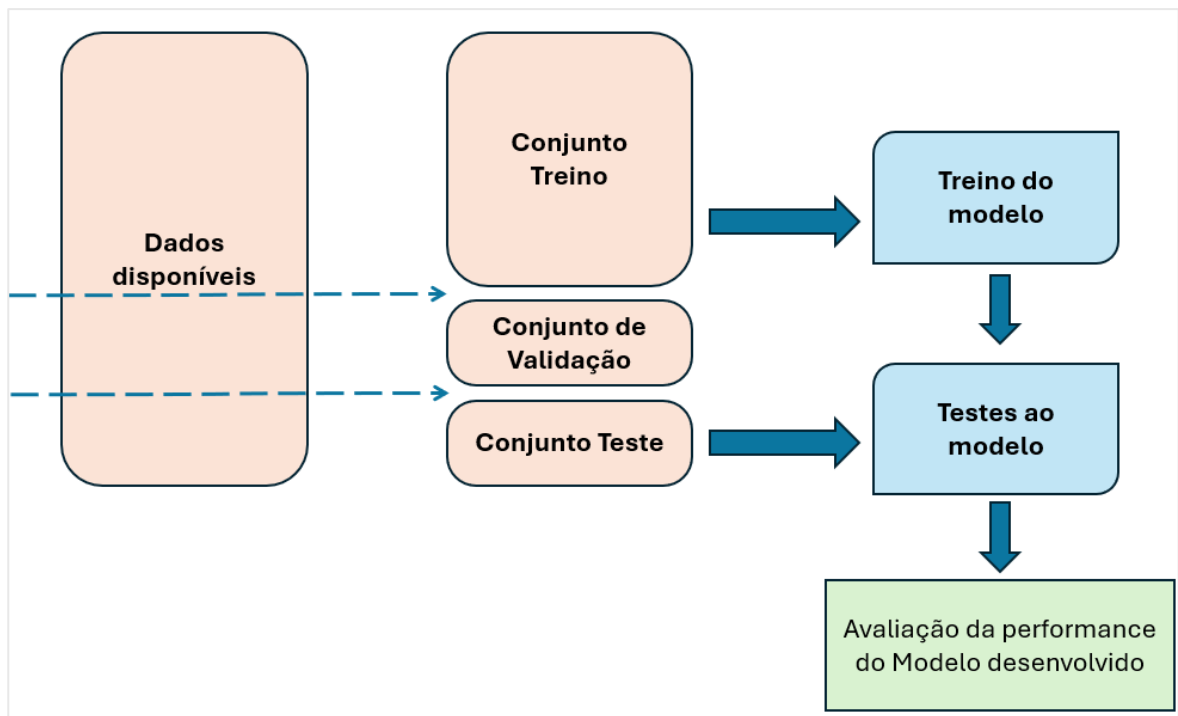
As camadas ocultas são geralmente compostas por 3 tipos de camadas: *convolução*, *pooling* e *ReLU*. As camadas de *convolução* identificam características locais das imagens de entrada, como os contornos e textura das mesmas. Cada neurónio artificial irá extrair estas características, reconhecê-las e organizá-las. As camadas de *pooling* reduzem a dimensionalidade da imagem, reduzindo o número de elementos das matrizes que são necessários ajustar, mas preservando a informação essencial. A redução da dimensionalidade minimiza a complexidade do modelo e reduz o fenómeno de *overfitting*, que ocorre quando a rede se ajusta excessivamente aos dados do conjunto de treino, prejudicando a sua capacidade de descobrir padrões em novos dados. Por último, as camadas *ReLU* linearizam os dados, tornando igual a zero os valores negativos e a função identidade (mantem os mesmos valores) para valores positivos.

A quantificação dos erros é um parâmetro importante na validação da rede. A melhor forma de o fazer é através da matriz de confusão. Abaixo apresentamos um exemplo simples de uma matriz de confusão.

**Tabela 1.** Exemplo de uma matriz de confusão.

		Condição Prevista pela Rede	
		<i>Com Lesão Renal</i>	<i>Sem Lesão Renal</i>
Classificação Real	<i>Com Lesão Renal</i>	Verdadeiro Positivo	Falso Negativo
	<i>Sem Lesão Renal</i>	Falso Positivo	Verdadeiro Negativo

Geralmente, os dados disponíveis para a rede de aprendizagem são divididos em 3 conjuntos, cada um com a sua função. A maioria dos dados deverão ser integrados no conjunto de treino, de forma a treinar e elaborar o modelo de aprendizagem. Os 2 restantes conjuntos são o conjunto de validação e teste. O conjunto de validação é facultativo e deverá ser formado por dados que visam validar o modelo à medida que a aprendizagem é realizada. Por sua vez, o conjunto de teste tem sempre de existir e deverá ser formado por dados para testar o modelo. É com este conjunto de dados, apresentados à rede pela primeira vez, que serão calculadas as variáveis de avaliação do modelo e a sua performance. [42]



**Figura 2.** Divisão dos dados para treino e teste do modelo.

O desempenho do modelo desenvolvido é avaliado, inicialmente, através do cálculo da precisão da rede durante o processo de treino, com o conjunto de treino. Durante o processo de treino, a precisão é determinada no fim de cada iteração. Se a precisão aumentar entre cada iteração significa que o processo de treino está a decorrer como é suposto e que a rede está a utilizar a função de perda para melhorar a sua previsão. Após a fase de treino estar completa, passamos à fase de teste, onde o desempenho do modelo é medido de forma mais completa com base nas previsões da rede. O conjunto de teste engloba dados nunca vistos pela rede. Se as previsões da rede forem muito positivas no conjunto de dados de treino, mas fracas no conjunto de dados de teste significa que o modelo se tornou demasiado específico para o conjunto de treino, tornando-se uma situação de *overfitting* do modelo. Nestas situações, o algoritmo perde a capacidade de generalizar as suas previsões, uma vez que memorizou padrões num conjunto restrito de dados. Por outro lado, um modelo que apresente fraco desempenho nos conjuntos de treino e de teste é considerado *underfitting*. Estas situações ocorrem quando não foram fornecidas à rede variáveis suficientes ou quando o modelo tende a simplificar demasiado o problema e não lhe é possível determinar padrões nos dados. [42]

A deteção de biomarcadores em espectros Raman é o problema ideal para ser resolvido através da implementação de um modelo baseado numa rede multicamada. Isto deve-se à capacidade destas redes de identificarem padrões em imagens e à sua aptidão de aprendizagem e adaptação a novos dados.

### 3. Desenvolvimento do sistema LUMINA

Este capítulo tem como objetivo especificar e descrever o processo executado para o desenvolvimento do sistema LUMINA, focado na parte da espectroscopia Raman. Com este propósito, iremos delinear os principais componentes do sistema, descrever os procedimentos seguidos para a sua montagem, alinhamento e calibração e, ainda, os métodos utilizados para os otimizar.

A metodologia adotada para o desenvolvimento deste sistema baseou-se na edição modular *Starter Edition*, disponível no site *OpenRAMAN*, com as devidas adaptações para atender às necessidades específicas deste projeto. Optou-se pelo desenvolvimento do espectrómetro *Starter Edition* por ser o mais simples e económico, adequado para atingir os objetivos estabelecidos na presente dissertação.

#### 3.1. Componentes do sistema Raman

Primeiramente, iremos apresentar os componentes fundamentais que constituem o sistema desenvolvido. Vamos subdividir o sistema desenvolvido em 4 componentes principais: fonte de radiação, suporte para cuvetes, elementos óticos e detetor. Adicionalmente, iremos referir o *software* de recolha de dados utilizado.

A maior parte dos componentes utilizados foram adquiridos no fornecedor *Thorlabs*. Este fornecedor oferece a vantagem de permitir a compra de peças individuais, além de disponibilizar uma ampla variedade de parafusos e outros elementos necessários para a construção do sistema. Esta flexibilidade facilita a personalização e a otimização dos componentes. No entanto, algumas partes do sistema necessitaram de ser modificadas ou fabricadas de raiz para se ajustarem adequadamente às especificidades do sistema. Estas partes, fabricadas no ISEL, serão detalhadas posteriormente.

Na **Figura 3** apresentamos um esquema do *setup* do sistema LUMINA, que inclui os principais componentes que vão ser referidos e descritos de seguida.

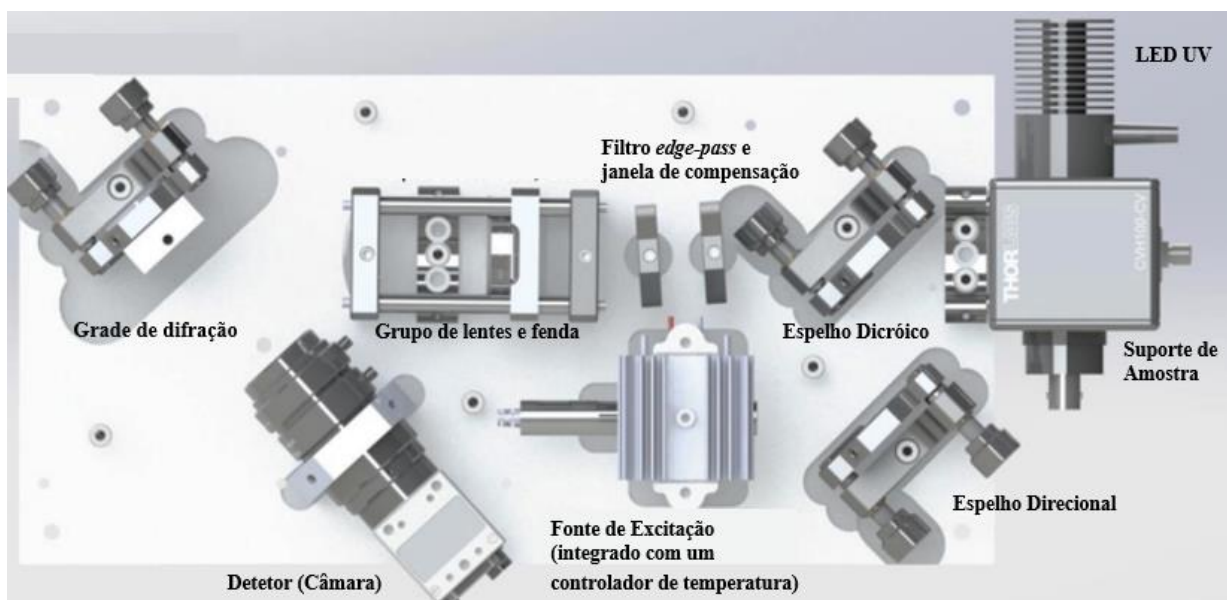


Figura 3. *Setup* sistema LUMINA, adaptado de [45].

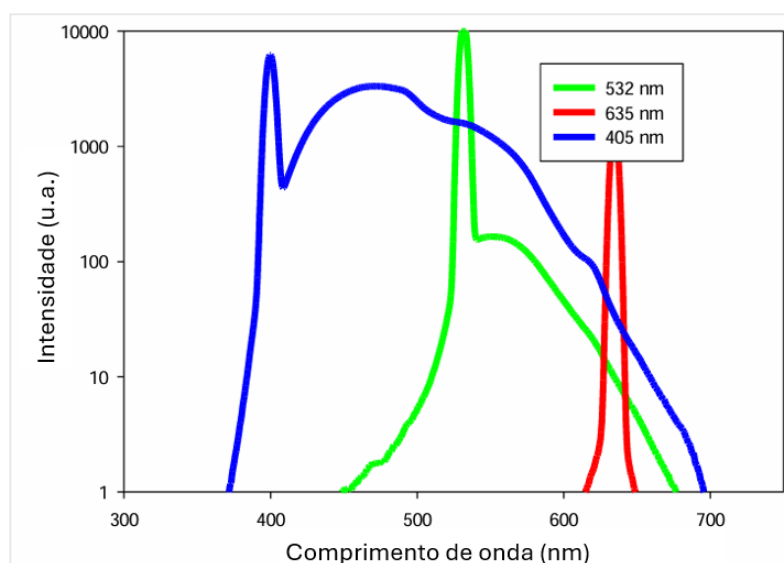
### 3.1.1. Fonte de radiação

Como referido no **Capítulo 2**, os lasers são considerados a fonte de radiação ideal para a espectroscopia Raman, devido, principalmente, à sua potência elevada e natureza monocromática.

O comprimento de onda e a gama de emissão do laser são fatores cruciais a ter em consideração durante o processo de seleção da fonte de radiação. A escolha do comprimento de onda do laser deve ter em consideração a emissão de fluorescência pela amostra e reduzir a mesma, minimizando a sobreposição dos picos Raman com os picos de fluorescência emitidos. De igual forma, a amplitude espectral, ou gama de emissão do laser, desempenha um importante papel na resolução espectral da técnica. Quando a amplitude de emissão do laser abrange uma ampla gama de comprimentos de onda, a resolução espectral tende a ser comprometida, dificultando a interpretação dos resultados e a atribuição correta dos modos vibracionais das moléculas presentes na amostra. Assim sendo, o laser escolhido necessita de ter um comprimento de onda que minimize a fluorescência emitida pela amostra e de ser o mais monocromático e estável possível.

De forma a determinar qual o comprimento de onda adequado para as análises Raman, quantificou-se a fluorescência emitida pela urina, quando irradiada com radiação de diferentes comprimentos de onda. Para isto, utilizou-se o espectrofluorímetro **FP-8300**, da *JASCO Corp.*, e irradiou-se a urina com três comprimentos de onda, 405 nm, 532 nm e 635 nm. Estes comprimentos de onda foram selecionados de forma a avaliar a resposta fluorescente da urina numa vasta gama, permitindo identificar quais os comprimentos de onda que causam menor fluorescência.

Desta análise resultou o gráfico da **Figura 4**, no qual o eixo das abcissas corresponde ao comprimento de onda e o eixo das ordenadas representa a intensidade da fluorescência emitida pela urina.



**Figura 4.** Espectros da fluorescência da urina em 3 comprimentos de onda de excitação, adaptado de [45].

Quando excitada com um comprimento de onda na zona do violeta, a 405 nm, a urina emite fluorescência com uma intensidade considerável numa elevada gama de comprimentos de onda. Desta forma, um laser com este comprimento de onda não é indicado para medições Raman, uma vez que existem muitos compostos na urina que emitem fluorescência quando excitados a 405 nm, havendo grande probabilidade de sobreposição de picos e interferência da fluorescência com o sinal Raman. A 532 nm a gama de emissão de fluorescência diminui, começando a 450 nm, com baixa intensidade, e depois dos 532 nm a intensidade da fluorescência decresce rapidamente. O pico presente a 532 nm decorre da radiação emitida pelo espectrofluorímetro, sendo por isso considerada como ruído. Apesar da emissão da fluorescência ser considerável, neste comprimento de onda os picos Raman são mais intensos, uma vez que o sinal Raman é mais forte com fontes de radiação com comprimentos de onda

menores. Por sua vez, a 635 nm a gama de fluorescência emitida pela amostra é muito curta, o que indica que os compostos da urina emitem pouca fluorescência quando excitados neste comprimento de onda. Este é, portanto, o comprimento de onda de excitação que minimiza a fluorescência emitida pela urina, porém é também o comprimento de onda que reduz a intensidade do sinal Raman, o que pode dificultar a análise dos espectros, principalmente com um laser de baixa potência.

Desta forma, após análise das vantagens e desvantagens de cada comprimento de onda, concluímos que o comprimento de onda que representa o melhor compromisso entre a qualidade do espectro Raman e a interferência da fluorescência, nesta fase de desenvolvimento do sistema, é o de 532 nm. Para reduzir a perturbação da fluorescência iremos, mais à frente, implementar técnicas como a utilização de filtros espectrais e processamento dos espectros obtidos.

Existem diversas opções de lasers de 532 nm, com gamas de emissão estreitas e de potência elevada, disponíveis no mercado, porém lasers com estas características podem ser bastante dispendiosos, não atendendo ao critério de baixo custo do sensor que pretendemos desenvolver.

Considerando a relação custo-benefício, o laser compacto de baixa potência **CPS532** da *Thorlabs*, foi identificado como a escolha mais adequada para o sistema Raman. Por ser compacto e de pequenas dimensões, torna-se um candidato ideal para integração em sistemas portáteis. Trata-se de um laser de estado sólido bombeado por diodo (DPSS) de funcionamento contínuo montado num suporte de alumínio, classificado como Classe de Segurança 3R, de acordo com os padrões de segurança ótica internacionalmente reconhecidos. Operável dentro de uma faixa de temperatura de 10°C a 40°C, o módulo do laser possuiu um diâmetro de 11 mm e emite um feixe com 3,5 mm de diâmetro. A potência típica deste laser é de 4,5 mW. Para a espectroscopia Raman, esta potência não é elevada, porém iremos otimizar o desempenho do laser no **subcapítulo 3.4**. O laser é alimentado pela fonte de alimentação **LDS5**, adquirida na *Thorlabs*.

A variação da temperatura de operação do laser impacta o seu funcionamento em diversas vertentes, influenciando tanto a estabilidade da radiação emitida quanto o comprimento de onda de emissão. Como parte da energia gerada pelo laser é dissipada em forma de calor, o laser pode atingir temperaturas elevadas, comprometendo a sua estabilidade e resolução espectral. Acrescentando a esta questão, temperaturas excessivas podem reduzir a vida útil do laser e, inclusive, causar danos irreparáveis no dispositivo. Levando em consideração estas questões, foi acrescentado ao laser um sistema de controlo de temperatura. Este controlador, para além de garantir estabilidade e durabilidade ao laser, irá permitir a obtenção de espectros sob condições constantes, garantindo maior estabilidade nos resultados.

O sistema implementado é composto por duas partes, um módulo de *Peltier*, que transfere o calor entre o laser e um dissipador, e o controlador **MTD415T**, inserido na *board MTD Series Evaluation Board*, da *Thorlabs*. Este controlador do tipo TEC Driver atua ajustando a corrente elétrica fornecida ao módulo de *Peltier*, que, tendo em conta a corrente, absorve ou dissipa energia térmica. Novamente, a escolha deste sistema de controlo teve em consideração o custo e a portabilidade do mesmo. A *Thorlabs* disponibiliza gratuitamente o *software MTD Series* que permite controlar o *TEC Driver*, permitindo ajustes de temperatura de forma simples e rápida. A figura abaixo contempla a página inicial do *software MTD Series*.



Figura 5. Software MTD Series para o controlo da temperatura do laser.

### 3.1.2. Suporte para cuvetes

O sistema Raman a ser desenvolvido tem como objetivo final ser utilizado numa abordagem de detecção trifásica. Desta forma, torna-se necessário encontrar um suporte para cuvetes que permita a implementação e adaptação de diferentes métodos de detecção. Com isto em mente, optou-se pela utilização do suporte **CVH100/M**, da *Thorlabs*.

Este suporte é compatível com diferentes tamanhos de cuvete e possui 4 entradas de luz, permitindo 2 caminhos de luz perpendiculares para medições de transmissão e fluorescência. Juntamente com o suporte são fornecidos um adaptador para fibras óticas SMA e 2 tampas, para serem colocadas nas entradas que não estão a ser utilizadas. Estas tampas e o próprio material do suporte, isolam completamente a amostra, evitando que a luz exterior interfira com as medições.

Para além disto, o suporte **CVH100/M** dispõe de um suporte para filtros ou lentes com espessura até 7 mm, situado entre a cuvete e uma das portas. Esta funcionalidade poderá tornar-se muito útil para aumentar a resolução do espectro Raman. Atualmente, este suporte contém uma lente que foca o laser no centro da cuvete.

Estas características tornam este suporte de amostras modular e personalizável, possibilitando várias configurações para atender à necessidade de utilização.



Figura 6. Vista superior do suporte de amostra utilizado.

### 3.1.3. Elementos óticos

O sistema é constituído por uma série de filtros e espelhos que, em conjunto, viabilizam a obtenção de espectros Raman com alta qualidade e resolução. Todos os elementos óticos foram adquiridos na *Thorlabs*.

O feixe de radiação de cor verde emitida pelo laser inicia o seu percurso ótico incidindo sob o espelho direcional, que direciona este feixe até ao espelho dicróico. O espelho dicróico atua como um filtro seletivo de cores, transmitindo e refletindo a luz de acordo com o seu comprimento de onda. Existem vários espelhos dicróicos disponíveis, projetados para refletir ou transmitir radiação em diferentes faixas de comprimentos de onda. Neste caso, pretendemos que toda a radiação emitida pelo laser, com comprimento de onda na zona verde do espectro eletromagnético, atinja a amostra e que toda a radiação com um comprimento de onda diferente seja eliminada. Desta forma, o espelho dicróico escolhido foi o **DMLP550**, com comprimento de onda de corte de 550 nm, este espelho reflete toda a radiação abaixo de 550 nm e transmite toda a radiação acima deste valor. Como observado no ponto inicial deste subcapítulo, o laser escolhido tem uma amplitude espectral baixa e é monocromático, por isso a radiação emitida pelo laser será refletida praticamente na sua totalidade em direção à amostra. Estes dois espelhos estão montados em suportes cinemáticos que permitem o alinhamento do feixe na amostra.

Antes de atingir a amostra, o feixe passa ainda por uma lente, integrada no suporte para cuvetes. As funções desta lente são focalizar o feixe de radiação numa área muito reduzida da cuvete, concentrando assim toda a radiação num ponto específico da amostra e captar a radiação dispersa pela amostra para o restante

percurso ótico. A lente foi adicionada ao suporte após a aquisição de alguns espectros de urina, e demonstrou-se essencial para o aumento da resolução espectral e para a redução do ruído nos espectros obtidos. Após a incidência e interação do feixe com a amostra, ocorre a dispersão de radiação, Raman e não-Raman, em todas as direções. Parte desta radiação dispersa é captada pela lente do suporte da cuvete e colimada em direção ao espelho dicróico. A radiação dispersa resultante do efeito Raman possui comprimentos de onda na gama amarelo-vermelho, superiores a 550 nm, sendo, por esta razão, totalmente transmitida pelo espelho dicróico e direcionada até ao filtro *edge-pass*. O filtro *edge-pass* remove toda a radiação não-Raman, como a radiação de Rayleigh, garantindo assim que apenas a radiação Raman prossigue o percurso ótico até ao detetor. O filtro selecionado foi o modelo **FELH0550**, que transmite comprimentos de onda superiores a 550 nm. Este filtro irá ter um papel importante na fase de ajuste da gama espectral do sistema.

A radiação, ao atravessar o espelho dicróico e o filtro *edge-pass*, sofre um deslocamento horizontal e vertical, devido à espessura destes componentes. Desta forma, para corrigir este deslocamento é necessário realinhar o feixe e compensar o mesmo. Este realinhamento é conseguido através da janela de compensação **WG11050-A**.

Após passar pela janela de compensação, o feixe de radiação é direcionado através de um conjunto de lentes e de uma fenda. A primeira lente acromática, **AC127-019-A**, colima o feixe, ajustando a sua direção e perfil. O feixe colimado irá ser direcionado para a fenda **S50K**, com 50  $\mu\text{m}$  de abertura, que permite o controlo preciso da quantidade de radiação que passa para as etapas subsequentes do sistema, impactando assim a resolução do espectrómetro. A última lente deste conjunto é a lente acromática **AC254-050-A**, que volta a ajustar a direção e o perfil do feixe.

Em seguida, o feixe atinge a rede de difração **GR25-120**, com uma densidade de 1200 linhas por milímetro. Esta rede de difração dispersa a radiação em direções dependentes do seu comprimento de onda, permitindo assim que o espectro da radiação seja medido com um sensor de imagem.

Finalmente, a radiação é captada pelo detetor que regista a intensidade da radiação em cada posição, correspondente a cada comprimento de onda.

#### **3.1.4. Detetor / Espectrómetro**

Como detetor, foi utilizada uma câmara *Blackfly GigE* da marca *FLIR*, especificamente o modelo **BFLY-PGE-31S4M-C**. A escolha deste modelo fundamenta-se na sua total compatibilidade com o *software* de recolha dos dados selecionado, garantindo assim uma integração perfeita da câmara no sistema desenvolvido. Este modelo *PointGrey* oferece uma resolução de 2048 x 1536 pixéis com um sensor do tipo CMOS.

A sua conectividade *GigE* permite uma transferência rápida e eficiente dos dados, minimizando o tempo de processamento e a perda de informação.

A lente de focagem escolhida para captar a radiação Raman foi a lente de 50 mm **MVL50M23** da *Thorlabs*.

#### **3.1.5. Software de recolha de dados**

O *software* selecionado para a aquisição e extração dos espectros Raman foi o **Spectrum Analyzer**, disponibilizado oficialmente no site *OpenRAMAN*. Este *software* foi concebido e otimizado para operar com o tipo de sistema desenvolvido, minimizando assim o risco de incompatibilidades e divergências nos espectros obtidos com o nosso sistema. Além disso, trata-se de um *software* de livre acesso que já foi previamente validado para utilização com o modelo de câmara escolhido, assegurando a compatibilidade com o sistema desenvolvido.

O *software* utilizado permite tanto o ajuste das configurações de aquisição quanto as de pós-processamento dos espectros. Em seguida, apresentaremos as principais configurações e discutiremos a

forma como impactam a qualidade do espectro final. Os ajustes destas configurações são essenciais para otimizar a aquisição dos espectros e garantir uma análise Raman precisa.

#### 3.1.5.1. Parâmetros de Aquisição

Os parâmetros de aquisição que podem ser manipulados através do *software* são: tempo de exposição (unidade: ms), ganho (unidade: dB), região de interesse (unidade: px) e número de imagens para a média.

A exposição controla o tempo durante o qual a câmara *PointGrey* “capta” a luz. Em espectroscopia, este parâmetro desempenha um papel fundamental, influenciando diretamente a intensidade do sinal recebido. Um longo tempo de exposição permite que uma maior quantidade de luz seja capturada pelo detector, resultando num aumento da intensidade do sinal, especialmente útil em situações onde o sinal recebido é fraco, como o sinal Raman. No entanto, uma exposição excessivamente longa pode causar a saturação do espectro, levando à perda de informações em áreas com sinais de alta intensidade. Um tempo de exposição curto pode prevenir a saturação do espectro, contudo ocorre o risco de produzir um nível de ruído mais elevado, o que complica a interpretação precisa dos resultados. Idealmente é recomendável selecionar o maior tempo de exposição possível, para captar uma maior quantidade de sinal, sem saturar o espectro. [46], [47]

O parâmetro ganho refere-se à amplificação do sinal elétrico gerado pelo sensor da câmara após capturar a luz. A seleção de um valor de ganho elevado intensifica o sinal, tornando o espectro mais intenso, no entanto, leva também à amplificação do nível de ruído presente no espectro. Por conseguinte, um ganho excessivamente alto pode resultar num espectro ruidoso, que torna complicada a análise precisa dos picos. Em contrapartida, um baixo ganho reduz a intensidade do sinal e ruído capturado, resultando num espectro mais limpo e com menos interferências. Contudo, se o ganho for excessivamente reduzido, o sinal pode tornar-se demasiado fraco, comprometendo a obtenção de informações importantes. Desta forma, o ganho deve ser ajustado para ser baixo o suficiente para maximizar a relação sinal-ruído (SNR), garantindo uma clara distinção dos picos, sem afetar a obtenção de informação crucial. [46]

A Região de Interesse (ROI) define a zona específica que a câmara irá capturar durante a aquisição dos dados. Reduzir o tamanho da ROI pode ser útil quando se pretende capturar áreas específicas do espectro, permitindo a captura detalhada de determinados picos, sem interferência de ruído nem de outros picos. Para além disto, a redução do ROI acelera a velocidade de aquisição de cada espectro, dado que a quantidade de informação que tem de ser processada é menor. Esta diminuição da velocidade de aquisição pode ser particularmente vantajosa em situações onde a rapidez de diagnóstico é essencial. Por outro lado, aumentar o tamanho da ROI permite capturar uma maior área do sensor, obtendo-se um espectro mais completo que inclui todas as suas informações. No entanto, uma ROI demasiado elevada pode sobrecarregar o processamento de dados com informações desnecessárias para a análise. Para testar e validar a hipótese inicialmente colocada na presente dissertação, é necessário analisar o espectro como um todo, capturando toda a informação disponível. Com isto em mente, a ROI foi fixada em 128 pixels. [46]

O último parâmetro de aquisição possível de ser ajustado é o número de imagens capturadas para cada espectro. Este parâmetro determina quantas imagens serão registadas e combinadas de modo a produzir o espectro final. Quando múltiplas imagens do mesmo espectro são combinadas, o ruído aleatório presente em cada imagem individual tende a ser minimizado no espectro final, pelo efeito da média, enquanto os picos Raman, que são consistentes em todas as imagens, se acumulam, melhorando assim o SNR. Para além disso, a captura de múltiplas imagens proporciona um espectro mais estável, pois compensa e suaviza pequenas variações que possam ocorrer ao longo do tempo, seja devido a flutuações na fonte de radiação ou à própria amostra. Novamente, em situações onde a rapidez de diagnóstico é crítica, aumentar o número de aquisições pode não ser o ideal, visto que prolonga o tempo de aquisição e de processamento dos dados. Se o sinal Raman for forte e o ruído for relativamente baixo, utilizar um menor número de aquisições pode ser adequado e suficiente para obter espectros de qualidade. Porém,

quando isto não se verifica, reduzir o número de aquisições pode comprometer a qualidade do espectro, resultando em picos menos distintos e num espectro com mais ruído. [46]

Portanto, para garantir que são obtidos espectros com alta resolução e qualidade, é fundamental otimizar cuidadosamente cada parâmetro de aquisição.

Adicionalmente, na secção dos parâmetros de aquisição é possível ativar ou desativar a filtragem mediana (*Enable Median Filtering*). A filtragem mediana é uma técnica de processamento de imagem amplamente utilizada para reduzir o ruído de uma imagem, sem comprometer os seus limites nem contornos. De maneira simplificada, esta técnica substitui o valor do pixel de entrada pela mediana dos valores dos pixels contidos na sua vizinhança. No contexto do *software* utilizado, é aplicado um filtro 3x3, onde o tamanho deste filtro determina a extensão da vizinhança considerada em torno de cada pixel. Esta abordagem é particularmente eficaz na remoção de ruído isolado, como pontos brilhantes ou escuros na imagem. [46], [48]

De acordo com o manual do *software*, é recomendável manter esta configuração ativa, dado que contribui significativamente para a qualidade final do espectro. Seguindo esta recomendação, optamos por manter a filtragem mediana ativa durante as aquisições.

### 3.1.5.2. Configurações dos Espectros

Para além de permitir alterar os parâmetros de aquisição, também é possível modificar as configurações de pós-processamento dos espectros obtidos.

A suavização *Boxcar* é uma técnica de processamento de sinais que visa reduzir o ruído nos dados espectrais e torná-los mais perceptíveis. Esta técnica funciona através de uma janela de suavização que se desloca ao longo de todo o sinal. Esta janela, ou *Boxcar*, abrange um determinado número de pontos consecutivos no espectro, o *software* utilizado permite selecionar o número de pontos pretendido. Em cada posição da janela é calculada a média dos valores dos pontos que esta abrange, esta média substitui o valor original do ponto central da janela. Desta forma, este método de suavização é útil na eliminação de sinais de alta frequência, porém a suavização excessiva pode levar à perda de detalhes importantes e à atenuação de picos significativos, comprometendo a resolução do espectro obtido. Posto isto, a recomendação presente no manual do *software* é colocar um intervalo de pontos de 5 a 7, para garantir um bom compromisso entre o SNR e a resolução espectral. Seguindo esta recomendação, mantivemos o número de pontos com valor de 5. [46]

Após a calibração do *software*, torna-se disponível a seleção das unidades do eixo das abcissas, existindo 3 alternativas: pixels, comprimento de onda e deslocamento Raman. Ao selecionar o deslocamento Raman, é possível também definir o comprimento de onda da fonte de radiação, de forma a corrigir o desvio dos espectros. [46]

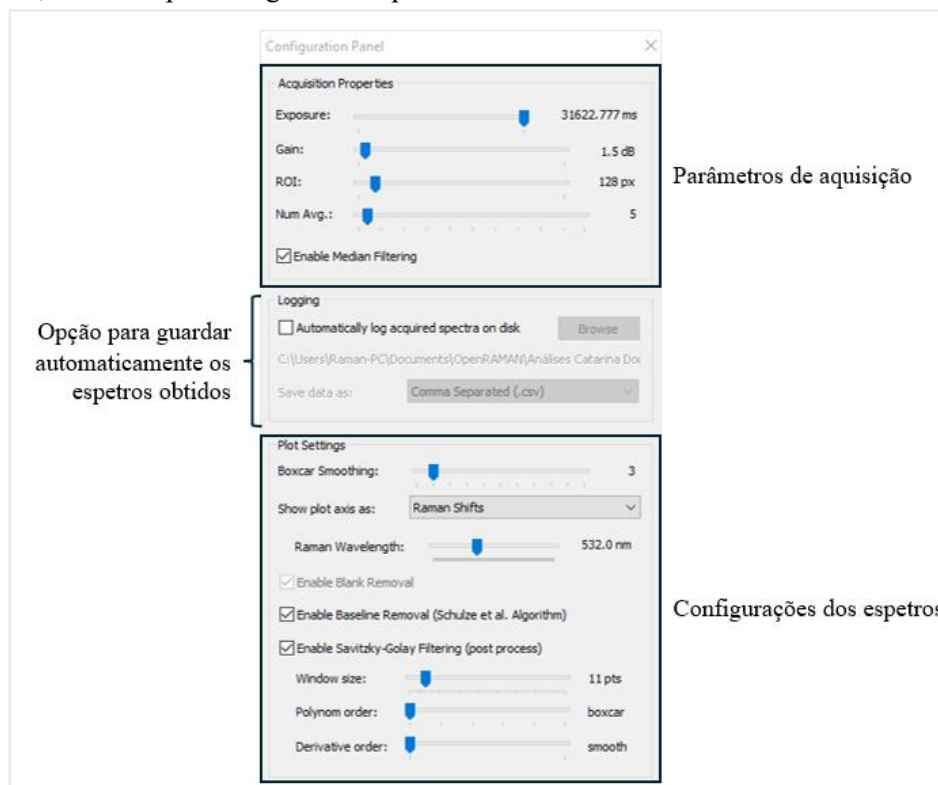
A opção de remoção do branco permite ativar ou desativar a subtração do branco ao espectro. O termo “branco” refere-se a uma medição de referência que captura o espectro de fundo ou de um padrão conhecido, sem a presença da amostra de interesse. Esta funcionalidade é bastante útil para identificar e eliminar a interferência do ruído de fundo instrumental ou de fluorescência. Durante as análises efetuadas no contexto da presente dissertação, a remoção do branco não foi necessária, desta forma, mantivemos esta opção desativa. [46]

Por último, existem mais 2 funcionalidades disponíveis: a remoção da *baseline* e a filtragem de *Savitzky-Golay*. A remoção da linha de base (*baseline*) tem como objetivo eliminar a contribuição do ruído de fundo e da fluorescência, realçando os picos Raman no espectro. Esta funcionalidade foi essencial para a obtenção de espectros Raman analisáveis, por isso manteve-se sempre ativa. [46]

Por sua vez, a filtragem de *Savitzky-Golay* é uma técnica de pós-processamento de sinais amplamente utilizada para suavizar espectros ou calcular as derivadas do sinal, preservando a forma e amplitude originais dos picos. O seu funcionamento tem algumas semelhanças à suavização *Boxcar*, anteriormente discutida, uma vez que também envolve a seleção de uma janela de pontos que percorre todo o espectro

e realiza os ajustes requeridos. No entanto, esta filtragem é mais sofisticada, visto que tem a capacidade de manter as características originais dos picos. A filtragem *Savitzky-Golay* permite o ajuste para diferentes ordens de polinômios e tamanhos de janela, permitindo uma maior flexibilidade e uma otimização precisa para diferentes tipos de dados e níveis de ruído. Esta técnica aplica um polinômio da ordem selecionada aos dados da janela, ajustando-os para suavizar o sinal sem comprometer a integridade dos picos Raman. A integridade dos picos Raman é essencial para a quantificação e identificação correta dos mesmos, por esta razão, a filtragem *Savitzky-Golay* demonstra-se muito útil em análises com esta tecnologia. Esta ferramenta de pós-processamento também se manteve sempre ativa, utilizando uma janela com 11 pontos, *boxcar* como ordem do polinômio e *smooth* como ordem da derivada. [46]

O ajuste de todos os parâmetros mencionados é realizado através do painel de configurações, acessível na barra de ferramentas do *software Spectrum Analyzer*. Na **Figura 7** apresentamos este painel de configurações, com a respectiva legenda dos parâmetros referidos.



**Figura 7.** Painel configuração do *software Spectrum Analyzer*.

### 3.2. Montagem do sistema Raman

Como mencionado anteriormente, a metodologia adotada para o desenvolvimento do sistema Raman teve como base a montagem da edição *Starter Edition*, apresentada no site *OpenRAMAN*. [49]

A montagem será detalhada passo a passo e, em cada etapa, serão listados os materiais necessários para completar a montagem de cada seção, quando aplicável, juntamente com imagens para auxiliar a compreensão das instruções. No identificador de cada material necessário foi adicionada uma hiperligação direta para este produto no *site* da *Thorlabs*.

1) O grupo de lentes e a fenda foram os primeiros componentes a serem montados e alinhados. Os materiais necessários para esta etapa estão detalhados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Descrição dos materiais necessários para a preparação do grupo de lentes e fenda.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">CP35/M</a>	Placa de gaiola para integrar lentes de 25,4 mm de diâmetro	1
<a href="#">ER3</a>	Haste de 7,6 cm para conetar e alinhar placas de gaiola	4
<a href="#">CP33B</a>	Suporte de 30 mm para a montagem das placas de gaiola	1
<a href="#">CRM1T/M</a>	Suporte rotativo para integrar lentes de 25,4 mm de diâmetro	1
<a href="#">S50K</a>	Fenda com 25,4 mm de diâmetro e 50 $\mu\text{m}$ de abertura	1
<a href="#">AC254-050-A</a>	Lente acromática com diâmetro de 25,4 mm e distância focal de 50 mm	1
<a href="#">ER1.5</a>	Haste de 3,81 cm para conetar e alinhar placas de gaiola	2
<a href="#">CP14/M</a>	Placa de gaiola para integrar lentes de 12,7 mm de diâmetro	1
<a href="#">AC127-019-A</a>	Lente acromática com diâmetro de 12,7 mm e distância focal de 19 mm	1

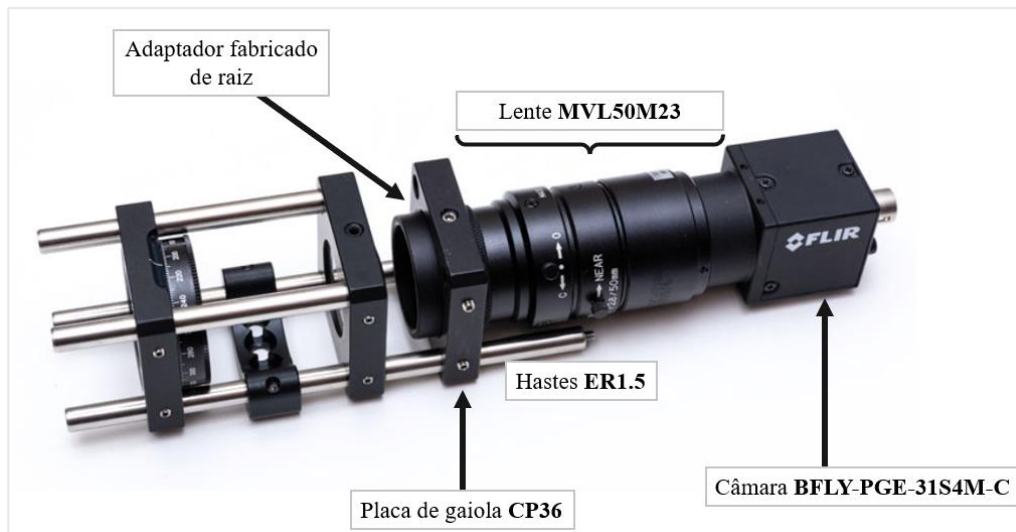
Primeiramente, a lente acromática **AC254-050-A** foi introduzida na placa de gaiola **CP35/M**, com a face curva da lente orientada para fora. A fenda **S50K** também foi introduzida no suporte rotativo **CRM1T/M**. Com as lentes colocadas, fixaram-se as 4 hastes **ER3** na placa de gaiola **CP35/M**, garantindo que todas estavam niveladas com a superfície da placa. Em seguida, nas hastes inferiores, colocou-se o suporte **CP33B**, sem o apertar completamente para permitir ajustes posteriores. De forma análoga à fixação da placa **CP35/M**, fixou-se o suporte rotativo da fenda nas hastes.



**Figura 8.** Componentes para a montagem do grupo de lentes e fenda, adaptado de [49].

De seguida, procedeu-se o alinhamento da fenda, colocada no suporte rotativo, com a lente **AC254-050-A**. Este alinhamento foi realizado fixando a câmara **BFLY-PGE-31S4M-C** à lente de focagem **MVL50M23** e este conjunto, conetado a duas hastes **ER1.5** através da placa de gaiola **CP36** e de um

adaptador fabricado de raiz. A lente foi ajustada para a posição focal no infinito. Para alinhar a fenda com a primeira lente, deslizou-se o suporte rotativo **CRM1T/M** ao longo das hastes até que a imagem obtida na câmara estivesse perfeitamente focada e nítida. Após encontrar a posição ideal, todos os parafusos do suporte **CRM1T/M** foram apertados de forma a fixar a sua posição.



**Figura 9.** Setup para o alinhamento da primeira lente acromática com o suporte rotativo da fenda, adaptado de [49].

O último passo da montagem do conjunto de lentes consistiu na adição e alinhamento da segunda lente acromática. A segunda lente acromática **AC127-019-A** foi inserida na placa de gaiola **CP14/M**, novamente com a face mais curvada da lente orientada para fora. A placa de gaiola **CP14/M** foi colocada na parte de trás da fenda rotativa, conetada com as 4 hastes **ER3**. Para o alinhamento da segunda lente seguiu-se o mesmo método utilizado para o alinhamento da primeira, mudando a câmara para o lado da segunda lente. Após a obtenção de uma imagem nítida e focada, a placa **CP14/M** foi firmemente fixada às hastes **ER3** e a estrutura temporária foi retirada ao conjunto de lentes.



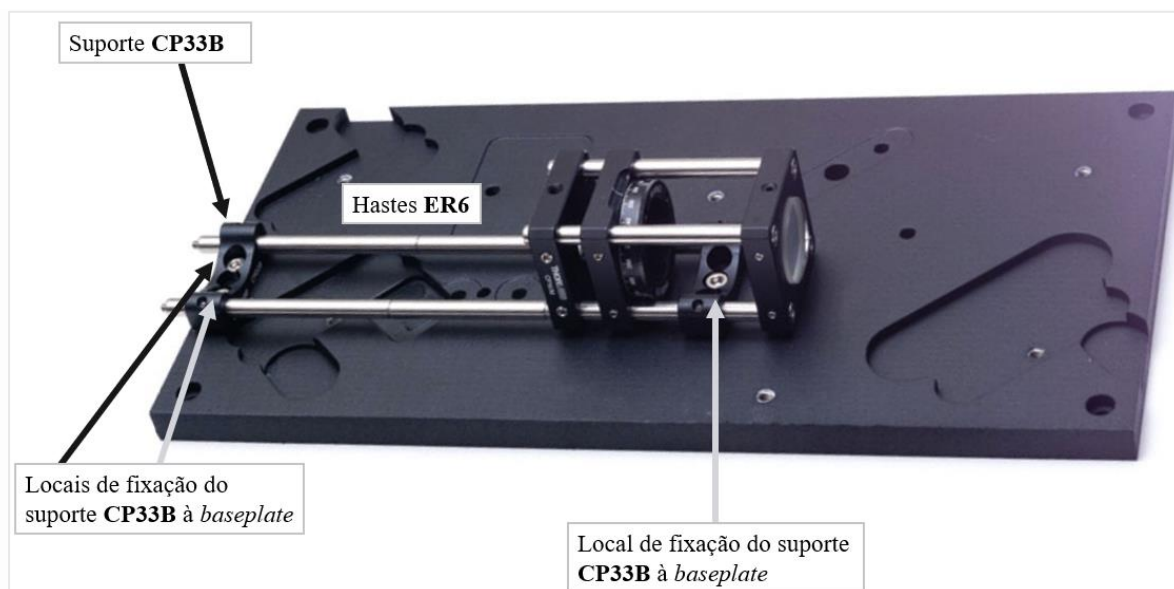
**Figura 10.** Conjunto das lentes e fenda rotativa.

- 2) O segundo passo consistiu na colocação do conjunto das lentes e fenda na *baseplate* do nosso sistema, juntamente com a base para o suporte de amostra. A *baseplate* utilizada foi fabricada no ISEL a partir de uma placa de alumínio por maquinação de controlo numérico computadorizado (CNC), de acordo com as distâncias e dimensões descritos no site *OpenRAMAN*.

**Tabela 3.** Descrição dos materiais necessários para a fixação do grupo de lentes, fenda e base para o suporte de amostra à *baseplate*.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">ER6</a>	Haste de 15,2 cm para conetar e alinhar placas de gaiola	2
<a href="#">CP33B</a>	Suporte de 30 mm para a montagem das placas de gaiola	1

As hastes temporárias **ER6** foram conetadas ao conjunto de lentes e, na outra extremidade, foi introduzido o suporte **CP33B**, de modo a ficarem alinhados. Para fixar os componentes na *baseplate*, foram utilizados parafusos do tipo M4x6 para segurar os 2 suportes **CP33B** e 1 parafuso adicional, do tipo M4x12, colocado na parte inferior da *baseplate*, para fixar o suporte rotativo da fenda **CRM1T/M**. Após garantir que todos os componentes estavam devidamente fixados e alinhados, procedeu-se à remoção das hastes temporárias **ER6**. Este processo garante o correto alinhamento entre a zona ótica e o suporte para cuvetes.



**Figura 11.** Fixação do conjunto de lentes, fenda e base para o suporte de amostra na *baseplate*, adaptado de [49].

- 3) O terceiro passo consistiu na fixação do detetor (câmara **BFLY-PGE-31S4M-C**) à *baseplate*.

**Tabela 4.** Descrição dos materiais necessários para a fixação do detetor na *baseplate*.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">CP33/M</a>	Placa de gaiola para integrar óticas de 25 mm de diâmetro	1

Para fixar a câmara na *baseplate*, colocou-se a lente de focagem **MVL50M23** na câmara e adicionou-se o suporte da mesma. Uma placa de gaiola **CP33/M** foi temporariamente adicionada na zona frontal da câmara para posicionar a mesma ao longo do eixo correto. Com um nível, ajustou-se a orientação do corpo da câmara de forma a garantir o alinhamento horizontal do sensor com a *baseplate*. Após o alinhamento, apertaram-se os parafusos M4x12 de fixação do suporte da câmara e removeu-se a placa **CP33/M**, completando assim a fixação da câmara.



Figura 12. Setup para fixação da câmara à baseplate, adaptado de [49].

- 4) O quarto passo compreendeu a instalação da rede de difração no suporte e na sua fixação à baseplate.

Tabela 5. Descrição dos materiais necessários para a montagem do conjunto da rede de difração.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#"><u>KM100</u></a>	Suporte cinemático com reguladores para espelhos de 25,4 mm de diâmetro	1
<a href="#"><u>GR25-1205</u></a>	Rede de difração com densidade de 1200 linhas por mm.	1

Procedeu-se à montagem do conjunto da rede de difração, fixando primeiramente a rede a um adaptador construído para o efeito e montado-o no suporte **KM100**. O suporte **KM100** é equipado com 2 reguladores que permitem ajustar o ângulo da rede de difração segundo dois eixos. A flexibilidade desta regulação permite a calibração precisa do sistema de forma a maximizar a qualidade dos espetros obtidos. Este conjunto foi então fixado à baseplate utilizando 1 parafuso do tipo M4x10.



Figura 13. Componentes do conjunto da rede de difração, adaptado de [49].

- 5) O quinto passo da montagem envolveu a fixação de todos os restantes componentes do sistema Raman na *baseplate*.

Tabela 6. Descrição dos materiais necessários para a fixação dos restantes componentes do sistema na *baseplate*.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#"><u>KM100</u></a>	Suporte cinemático com reguladores para espelhos com 25,4 mm de diâmetro	2
<a href="#"><u>FMP1/M</u></a>	Suporte fixo para lentes com 25,4 mm de diâmetro	2
<a href="#"><u>PF10-03-G01</u></a>	Espelho direcional com 25,4 mm de diâmetro	1
<a href="#"><u>DMLP550</u></a>	Espelho dicróico com 25,4 mm de diâmetro, que reflete comprimentos de onda inferiores a 550 nm	1
<a href="#"><u>FELH0550</u></a>	Filtro <i>edge-pass</i> com 25 mm de diâmetro que transmite comprimentos de onda superiores a 550 nm	1
<a href="#"><u>WG11050-A</u></a>	Janela de ompensação usada para compensar o desvio feixe	1

O espelho direcional, **PF1003-G01**, e o espelho dicróico, **DMLP550**, foram integrados em 2 suportes cinemáticos **KM100** e fixados à *baseplate* com 2 parafusos do tipo M4x10. Novamente, a principal vantagem dos suportes **KM100** é a possibilidade de ajustar a orientação dos espelhos segundo dois eixos, o que irá ser particularmente útil para o alinhamento do feixe do laser com o eixo ótico do sistema. É crucial que o espelho dicróico **DMLP550** seja posicionado com a superfície refletora e brilhante orientada para o feixe de entrada, de forma a garantir a correta reflexão e transmissão da radiação dentro do sistema.

O filtro *edge-pass*, **FELH0550**, e a janela de compensação, **WG11050-A**, foram montados em 2 suportes fixos **FMP1/M**, posicionados na *baseplate* através de 2 parafusos do tipo M4x12, inseridos na parte inferior da base.

6) De seguida, foi efetuada a montagem do sistema de controlo de temperatura do laser.

Tabela 7. Descrição dos materiais necessários para o controlo da temperatura de funcionamento do laser.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">MTDEVAL1</a>	<i>Evolution Board</i> para <i>TEC drivers</i> de controlo de temperatura	1
<a href="#">MTD415TE</a>	<i>TEC driver</i> para o controlo de temperatura	1

O suporte do laser foi efetuado de raiz, através de uma impressora 3D, para acomodar o módulo de *Peltier*. O suporte foi fixado na *baseplate* com 2 parafusos do tipo M4x12.

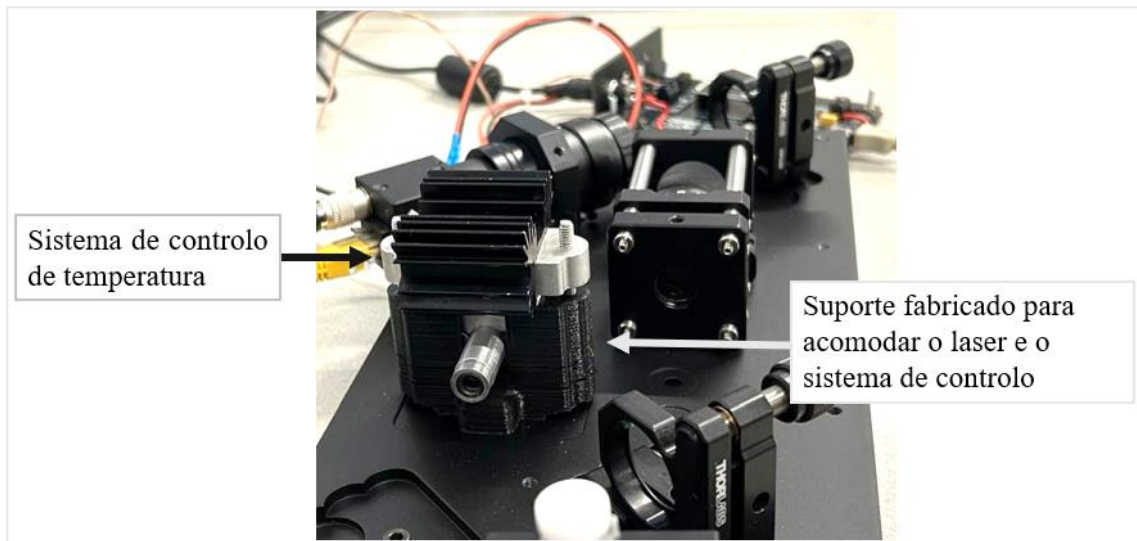


Figura 14. Detalhe do suporte fabricado para acomodar o laser CPS532 e o sistema de controlo de temperatura.

Na figura abaixo demonstramos o controlador utilizado para regular e monitorizar a temperatura de funcionamento do laser.

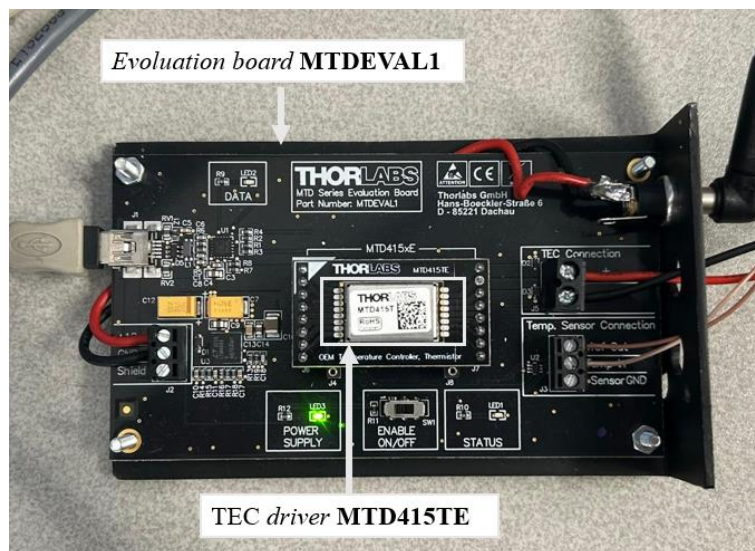


Figura 15. Controlador da temperatura de funcionamento do laser.

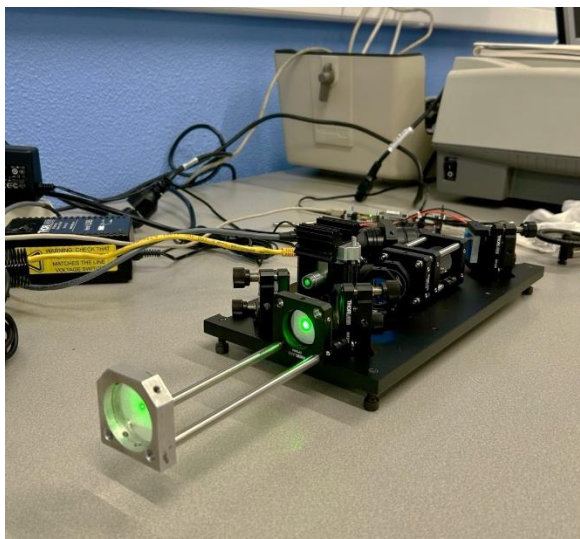
## 7) Preparação do sistema para o alinhamento do feixe do laser.

Nesta fase, a montagem do sistema Raman encontra-se quase concluída, porém é necessário um passo adicional na montagem, que irá permitir a realização do alinhamento do feixe do laser com o eixo ótico do sistema. Este alinhamento constitui uma etapa fundamental que assegura o correto funcionamento do sistema.

**Tabela 8.** Descrição dos materiais necessários para o alinhamento do feixe do laser.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">ER6</a>	Haste de 15,2 cm para conectar e alinhar placas de gaiola	2
<a href="#">CP06/M</a>	Placa de gaiola para integrar óticas de 25 mm de diâmetro, equivalente ao modelo <b>CP33/M</b>	1

Posto isto, adicionou-se 2 hastes de extensão **ER6** ao suporte **CP33B**, previamente fixado na *baseplate* no passo 2). Nestas hastes, fixou-se a placa de gaiola **CP06/M**, junto ao suporte **CP33B**, e uma placa de gaiola de metal na outra ponta das hastes. Em cada placa foi adicionada fita adesiva com um orifício central.



**Figura 16.** Montagem para o alinhamento feixe do laser com o eixo ótico do sistema Raman.

## 8) Fixação do suporte da amostra.

Esta etapa indica o fim da construção de todos os componentes do sistema Raman.

**Tabela 9.** Descrição dos materiais necessários para a montagem do suporte para cuvetes.

Identificador <i>Thorlabs</i>	Descrição	Quantidade
<a href="#">CVH100/M</a>	Suporte para micro e macro cuvetes	1
<a href="#">CVH100-CV</a>	Tampa para suportes CVH100/M	1

Após a etapa de alinhamento do feixe ótico do laser, que irá ser devidamente explicada no próximo subcapítulo, as hastes de extensão **ER6** foram retiradas e, no seu lugar, fixou-se o suporte para cuvetes **CVH100/M**.

Com o propósito de proteger a instrumentação do sistema de interferências externas, foram desenvolvidas 2 tampas feitas à medida para cobrir toda a sua parte ótica. Estas tampas foram fabricadas, utilizando uma impressora 3D, garantindo uma vedação eficaz da luz e protegendo o sistema de impurezas exteriores. Em seguida, apresentamos uma imagem da vista superior do sistema Raman desenvolvido.

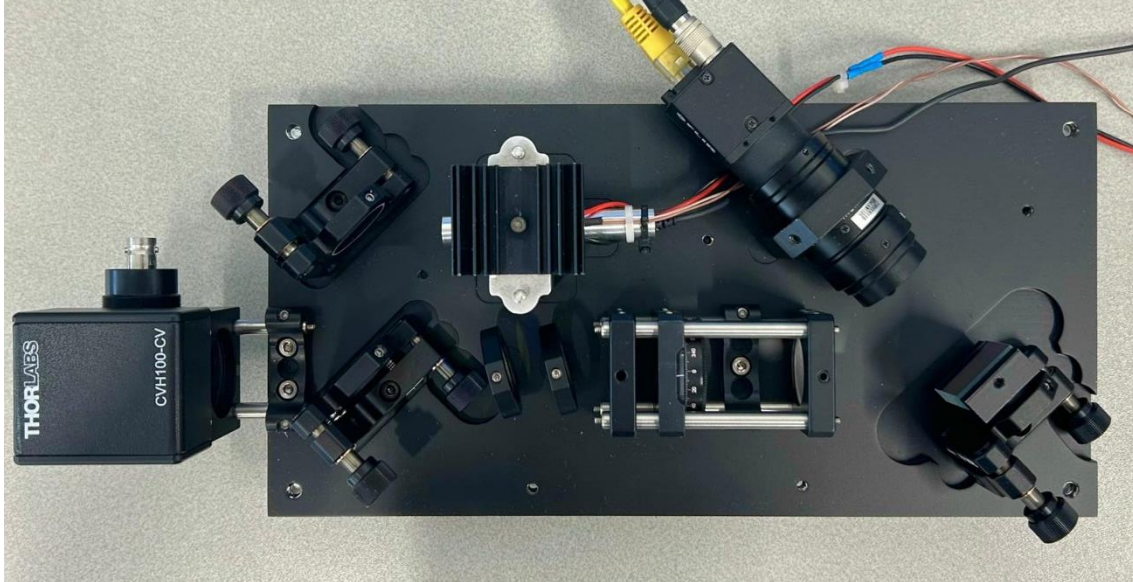


Figura 17. Vista superior do sistema Raman desenvolvido.

#### 9) Ligação da câmara ao computador.

O último passo necessário para o sistema estar pronto a funcionar é a conexão da câmara **BFLY-PGE** ao computador, onde irão ser realizadas as aquisições dos espectros. Primeiramente, ligou-se a câmara ao computador utilizado, através dos cabos de Ethernet e de GPIO/alimentação.

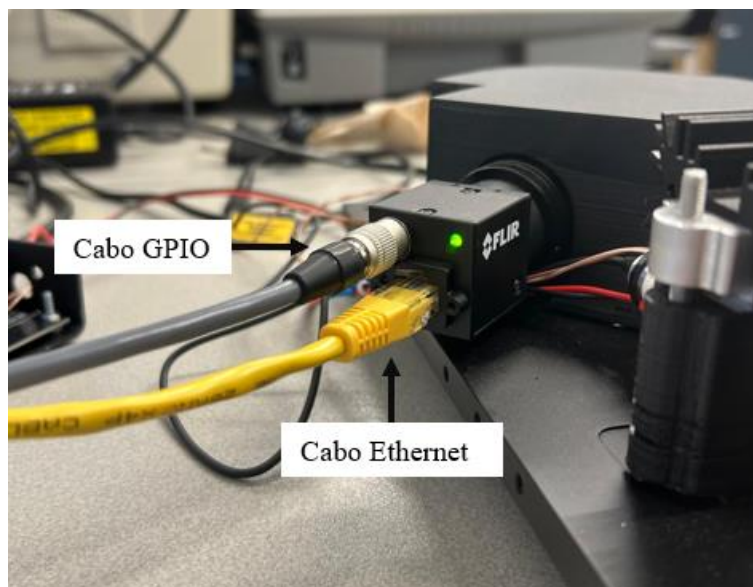
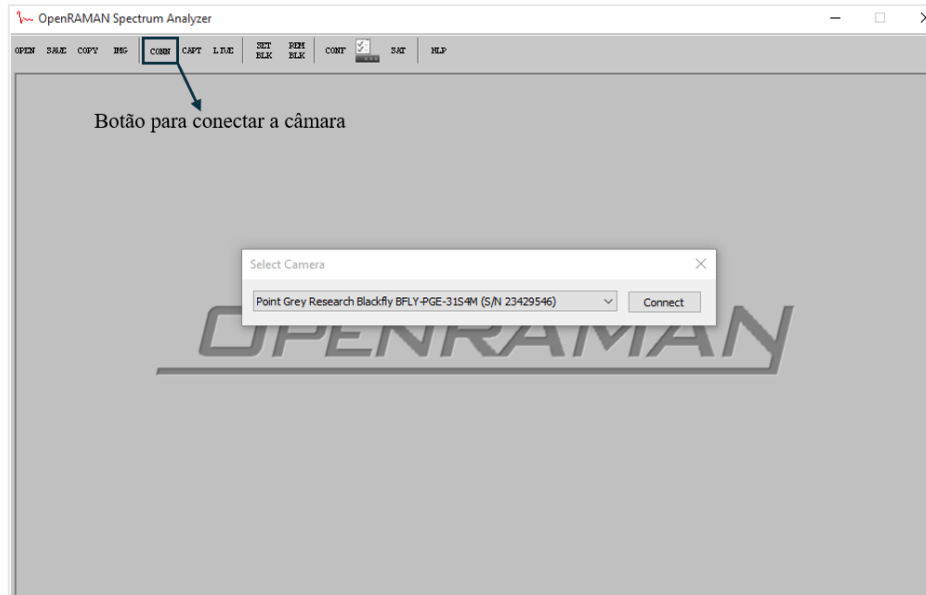


Figura 18. Detalhes da ligação da câmara ao computador.

Em seguida, as configurações IP da câmara foram ajustadas, conforme indicado no guia de introdução às câmaras **BFLY-PGE**, assegurando uma correta comunicação entre os dispositivos. [50]

Após a ligação da câmara ao computador e a realização das devidas configurações, procedeu-se à conexão da câmara ao *software* **Spectrum Analyzer**. A conexão da câmara é efetuada a partir do botão ‘Connect’, presente na barra de tarefas do *software*. Se a câmara estiver corretamente ligada ao computador, o *software* abrirá um separador *pop-up* no qual é necessário selecionar a câmara que se pretende utilizar, como é possível visualizar na figura abaixo.



**Figura 19.** Conexão da câmara **BFLY-PGE** ao *software*.

### 3.3. Alinhamento e calibração do sistema Raman

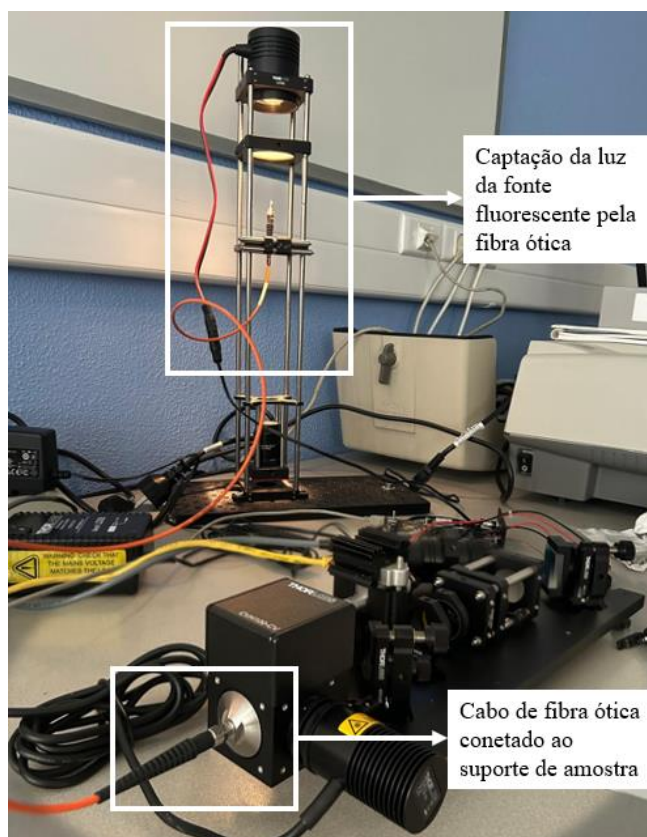
O alinhamento e a calibração do sistema Raman constituem duas etapas fundamentais para assegurar a obtenção de leituras precisas e reproduzíveis do sinal emitido pela amostra. Para além disso, estas práticas permitem amplificar a sensibilidade da técnica e reduzir o ruído presente nos espetros.

A primeira fase do processo de alinhamento consiste em alinhar o feixe do laser com o eixo ótico do sistema, através da regulação do ângulo e da orientação do espelho direcional e do espelho dicróico. Assim, garantimos a adequada focalização da radiação incidente na amostra. A montagem para este alinhamento, descrita no subcapítulo anterior, encontra-se na **Figura 16. Montagem para o alinhamento feixe do laser com o eixo ótico do sistema Raman.**

O objetivo da primeira fase do alinhamento é alinhar o feixe do laser com os 2 orifícios das fitas adesivas. Para isso, regulou-se o espelho direcional, permitindo a interseção do feixe com o centro da fita adesiva mais próxima ao sistema e também o espelho dicróico, que alinha a interseção do feixe com o orifício da fita adesiva mais distante ao sistema.

Após alinhar o feixe aos 2 orifícios, as hastes foram retiradas e prosseguiu-se para a fase seguinte do alinhamento, que engloba o alinhamento dos filtros, da fenda rotativa e da rede de difração, com o propósito de assegurar que a imagem capturada pela câmara está adequadamente alinhada, horizontalmente e verticalmente. Este ajuste foi realizado utilizando a fibra ótica **SMA905** e uma fonte de luz fluorescente. O cabo de fibra ótica tem como função captar a luz da fonte fluorescente e transmiti-la até à câmara **BFLY-PGE**. A fibra ótica foi integrada no suporte de amostra **CVH100/M**, através do adaptador para fibras óticas SMA, fornecido junto com o suporte.

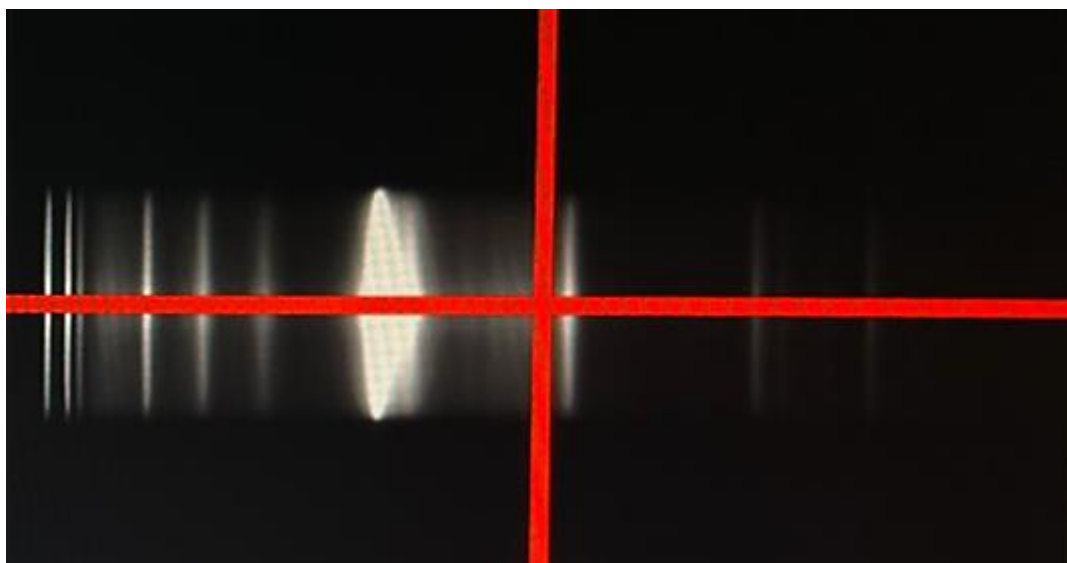
A imagem capturada pela câmara foi visualizada utilizando o *software* **SpinView**.



**Figura 20.** Montagem para o alinhamento do sistema utilizando uma fonte de luz fluorescente.

Notou-se que o sinal estava a chegar à câmara com baixa intensidade, por isso foi necessário ajustar a montagem de captação da luz da fonte fluorescente. Após o ajuste da montagem, adquiriu-se então a imagem captada pela câmara.

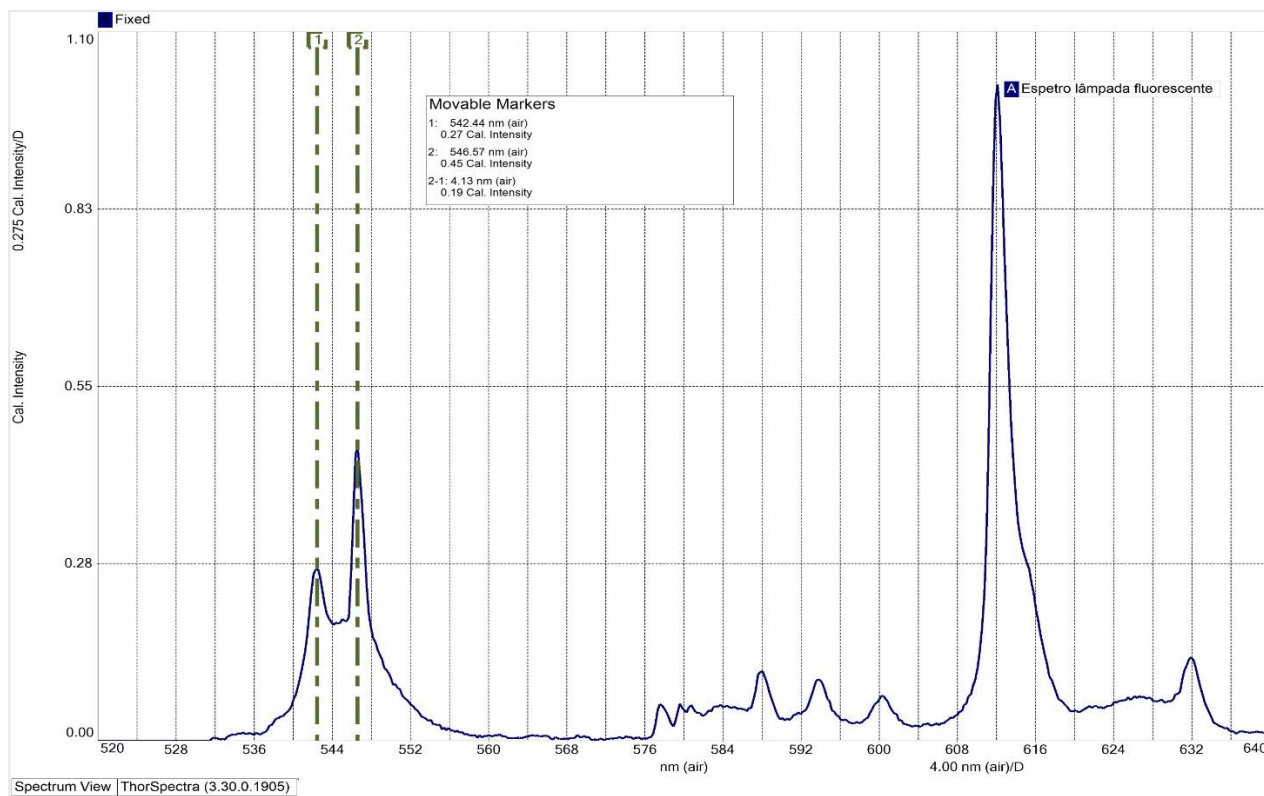
Na imagem obtida pela câmara visualiza-se uma série de linhas verticais (imagens da fenda) que representam o feixe de radiação após ser dividido pela rede de difração, nos seus vários comprimentos de onda. O objetivo é ajustar estas bandas verticais, garantindo assim o alinhamento da rotação da fenda e da rede de difração. O modo “Crosshair” do *software SpinView* auxiliou no alinhamento das bandas obtidas, uma vez que coloca uma “mira” no centro *display*, que serviu como o eixo de referência. Para alinhar as bandas com o eixo horizontal da “mira”, regulou-se o ângulo de incidência da rede de difração, através do ajuste dos reguladores presentes no seu suporte **KM100**. Por sua vez, para orientar as bandas de acordo com o eixo vertical da “mira”, ajustou-se o suporte rotativo **CRM1T/M**, regulando assim a percentagem de abertura da fenda. Quando as linhas verticais ficaram devidamente alinhadas, apertou-se os parafusos de fixação do suporte da rede de difração e do suporte da fenda, de modo a fixar a posição destes dois componentes.



**Figura 21.** Espectro da lâmpada fluorescente obtido pela câmara, após alinhamento.

O passo seguinte foi ajustar a gama espectral da câmara, utilizando a mesma lâmpada fluorescente como fonte de radiação. Esta etapa tem como objetivo remover os comprimentos de onda inferiores a 546,5 nm, limitando a gama do sensor a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Mais tarde, tornou-se necessário repetir este processo de ajuste, para limitar a gama do sensor a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Uma lâmpada fluorescente tem dois picos caraterísticos localizados a 542,4 nm e a 546,5 nm. Convertendo estes valores para números de onda, tendo em conta que a fonte de radiação que vamos utilizar tem um comprimento de onda de 532 nm, estes picos localizam-se a  $360\text{ cm}^{-1}$  e a  $498\text{ cm}^{-1}$ . De forma a confirmar a existência destes dois picos na lâmpada utilizada, realizámos uma rápida análise espectral da mesma, utilizando o espectrómetro CCD compacto da *Thorlabs*, modelo **CCS200/M**. O espectrómetro **CCS200/M** liga-se diretamente ao computador, através de ligação USB, e o espectro obtido tem de ser lido no *software ThorSpectra*, disponibilizado gratuitamente pela *Thorlabs*.



**Figura 22.** Análise espectral da lâmpada fluorescente utilizada, com a confirmação dos picos a 542,4 nm e a 546,5 nm.

Ambas as **Figuras 21 e 22** apresentam o espectro da lâmpada fluorescente, demonstrando a correspondência entre os picos obtidos pelo espectrômetro e as bandas capturadas pela câmara. Podemos observar que as 2 bandas iniciais da **Figura 21** correspondem aos picos localizados a 542,4 nm e a 546,5 nm. Além disso, a cerca de 612,3 nm, existe um pico de alta intensidade, visível na imagem obtida pela câmara como uma banda mais larga e intensa. Desta forma, sabendo o comprimento de onda de cada banda, conseguimos delimitar a gama espectral do nosso sistema através da imagem obtida pela câmara. O elemento ótico responsável por controlar a gama espectral do sistema é o filtro *edge-pass*. Este filtro bloqueia a passagem de comprimentos de onda abaixo de um determinado valor.

Inicialmente, o objetivo era limitar o sinal a  $500\text{ cm}^{-1}$ , assim ajustamos o ângulo do filtro *edge-pass*, de modo a remover da imagem da câmara a primeira banda a 542,4 nm. Aproximou-se a banda de 546,5 nm da borda esquerda do *display*, maximizando a gama de número de onda do sensor de  $500 - 3500\text{ cm}^{-1}$ . Ainda nesta fase, ajustou-se o ângulo da janela de compensação, de forma a aumentar o tamanho vertical das bandas obtidas.

Após a conclusão deste procedimento e fixação do filtro *edge-pass* e janela de compensação, o sistema está devidamente alinhado e com a gama espectral corretamente limitada.

O próximo passo foi a calibração espectral da câmara. Esta etapa é crucial para garantir que os comprimentos de onda medidos pela câmara correspondem aos valores reais dos picos Raman. Durante uma etapa típica de calibração, é utilizada uma fonte luminosa com linhas espectrais conhecidas, de forma a termos um espectro de referência bem definido. O espectro da fonte luminosa é adquirido pelo detetor e os picos medidos são comparados com os picos de referência. A escala do comprimento de onda é então ajustada para alinhar os valores medidos com os valores de referência, compensando assim variações instrumentais do detetor utilizado. Sem uma calibração eficaz, os valores de *Raman Shift* (número de onda) obtidos podem estar deslocados, resultando em interpretações incorretas dos espectros Raman.

A calibração do nosso detetor foi efetuada diretamente com o *software Spectrum Analyzer*. Para isto, realizou-se a aquisição do espectro de uma lâmpada Néon de referência. Após a aquisição do espectro, selecionou-se a opção ‘Calibrate’, disponível na barra de ferramentas do *software*, como tipo de fonte

selecionou-se a lâmpada Néon. Esta ferramenta irá colocar identificadores nos locais onde deveriam estar os principais picos Raman. Para calibrar o detetor, ajustou-se os parâmetros do *software* e selecionou-se o botão ‘Calibrate!’.

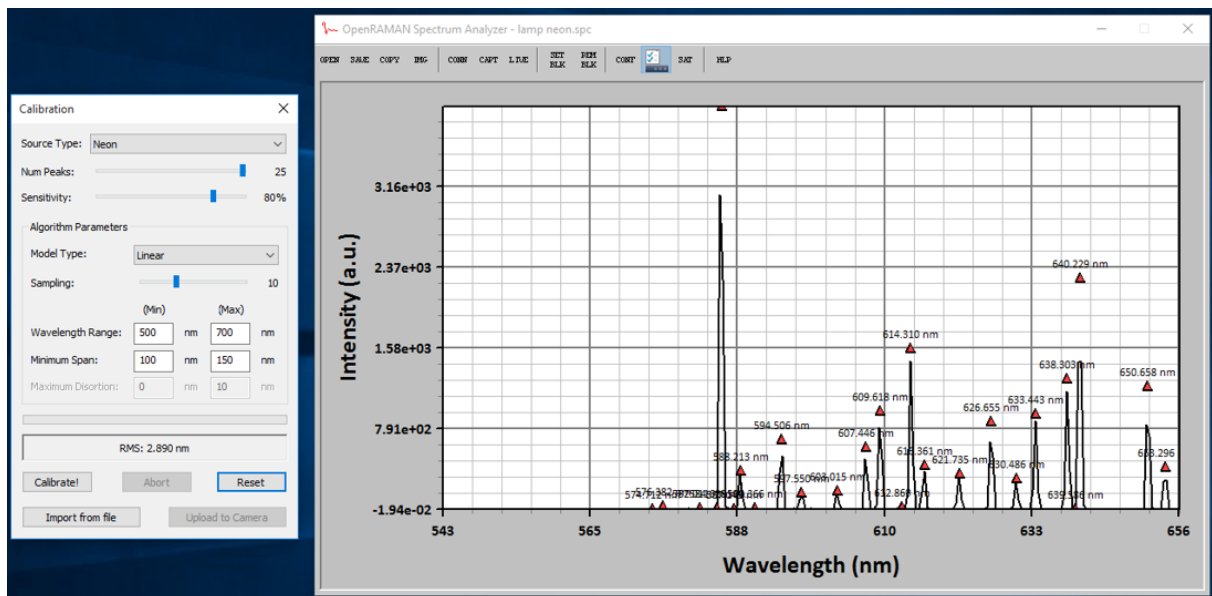


Figura 23. Calibração espectral da câmara com lâmpada Néon.

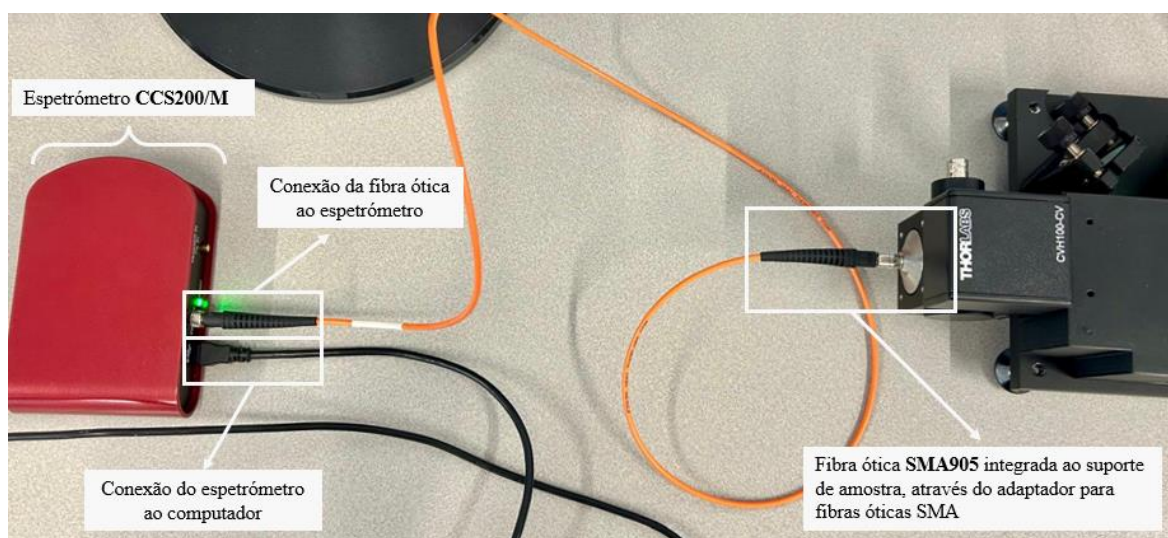
### 3.4. Otimização dos componentes do sistema

#### 3.4.1. Fonte de radiação

A fonte de radiação, o laser **CPS532**, é o principal componente deste sistema que deve ser otimizado, dado que é o elemento que mais impacta a eficácia da técnica Raman. Como referido anteriormente, o laser selecionado não possui uma resolução espectral elevada, sendo por esta razão necessário melhorar esta característica.

A temperatura de funcionamento do laser afeta vários parâmetros do mesmo, incluindo a sua resolução espectral. Desta forma, alterando a temperatura do laser podemos obter uma resolução espectral otimizada e diminuir a sua gama de emissão, tornando o laser **CPS532** mais eficiente para análises Raman. Para testar esta teoria, foram realizadas duas experiências distintas. Numa primeira fase, averiguou-se a influência da temperatura na largura à meia altura (FWHM) do pico do laser **CPS532**. Para obter o espectro do laser, utilizou-se o espectrómetro **CCS200/M** e, para capturar o feixe do laser, o cabo de fibra ótica **SMA905**, adquirido na *Thorlabs*. A fibra ótica foi integrada no suporte de amostra **CVH100/M**, da mesma forma como foi efetuado durante o alinhamento do sistema.

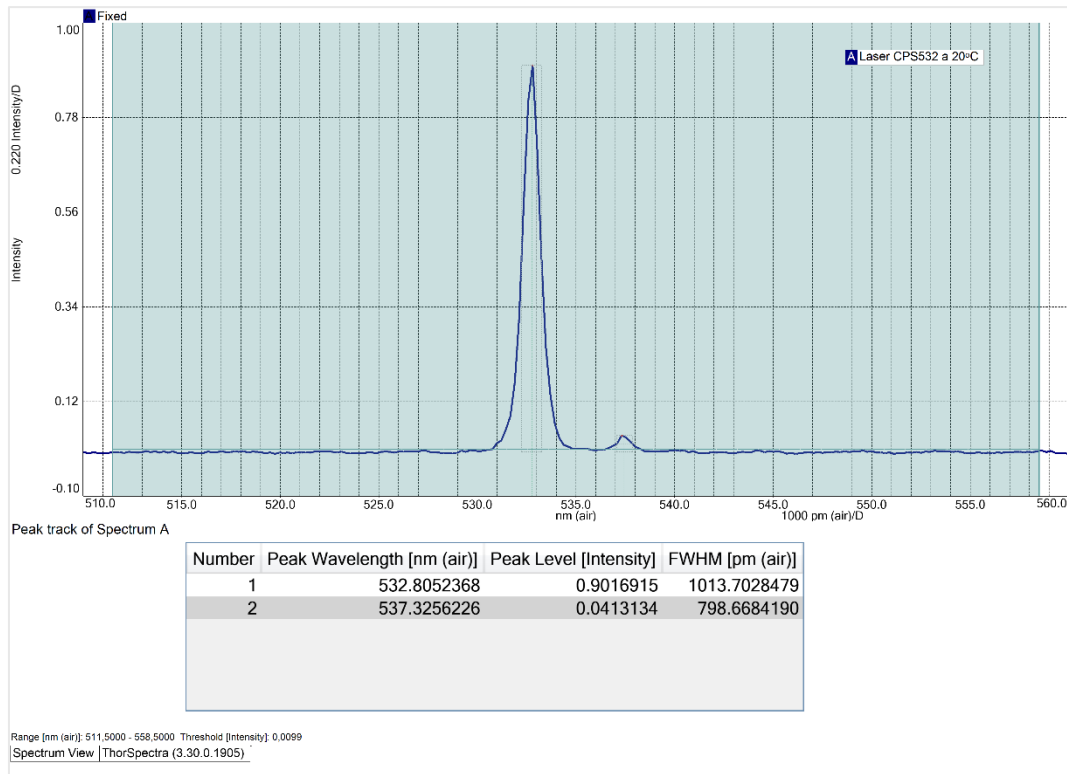
A **Figura 24** demonstra e explica o *setup* realizado para a obtenção do espectro do laser **CPS532**, utilizando o espectrómetro **CCS200/M**.



**Figura 24.** *Setup* para obtenção do espectro do laser **CPS532**.

No decorrer da preparação do *setup*, ligou-se o sistema de controlo de temperatura e o *software* **MTD Series**. Como a primeira temperatura que iremos estudar é 20°C, colocou-se o *setpoint* da temperatura neste valor.

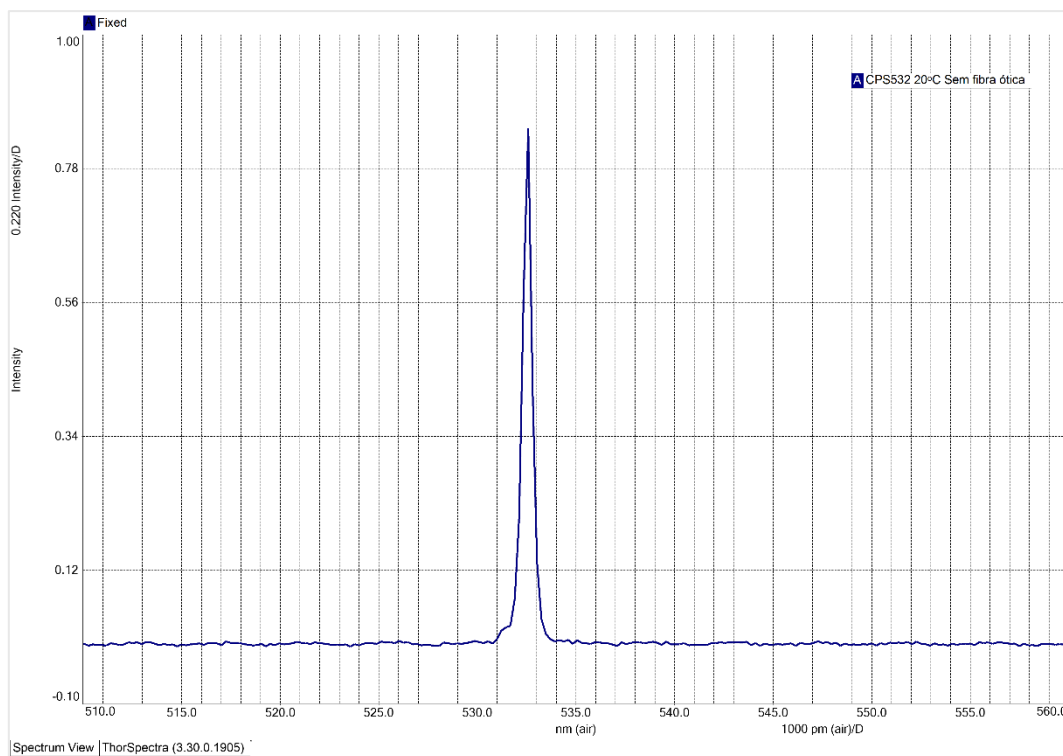
Após a conexão do espectrómetro ao *software* **ThorSpectra** e a estabilização da temperatura do laser a 20°C, prosseguiu-se com a aquisição do espectro. Importante constatar que todos os espectros do laser foram adquiridos utilizando um tempo de integração de 0,1 ms, com o intuito de evitar a saturação do espectro.



**Figura 25.** Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 20°C.

A **Figura 25** foi retirada diretamente do *software ThorSpectra* utilizando a ferramenta de análise ‘Peak Track’. Esta ferramenta monitoriza os picos existentes no espectro e retira a sua posição, intensidade e largura. Com temperatura de funcionamento a 20°C, o espectro do laser **CPS532** apresenta 2 picos, o principal, localizado a 532,8 nm, e um secundário, localizado a 537,3 nm. A intensidade do pico principal é de 0,90 e a sua FWHM é de 1013,7 pm.

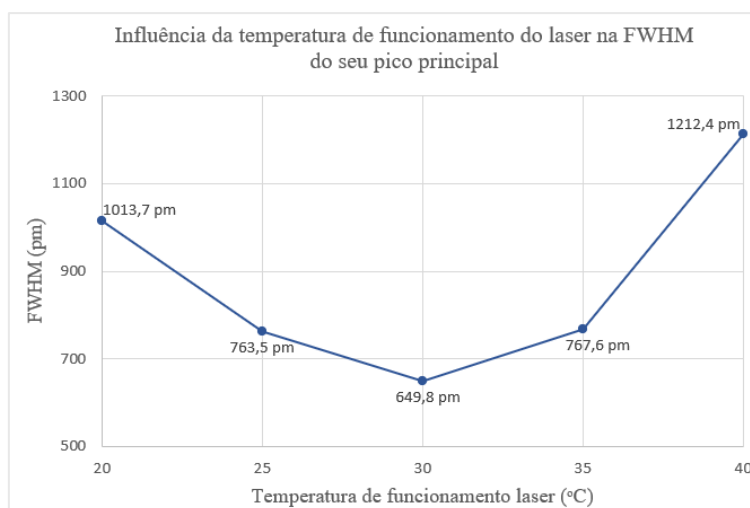
Apesar do pico secundário, localizado a 537,3 nm, ter uma intensidade reduzida, de apenas 0,04, pode interferir com os espectros Raman e alterar os resultados obtidos. Desta forma é essencial averiguarmos a razão da sua existência e eliminá-lo. No site da *Thorlabs* não existe qualquer evidência da emissão deste pico secundário pelo laser utilizado, assim, resta-nos colocar a hipótese de ser um pico derivado da fibra ótica. Para testar esta hipótese, realizámos um estudo adicional, à temperatura de 20°C, no qual o feixe do laser foi focalizado diretamente no orifício de entrada de radiação do espectrómetro, sem a fibra ótica como intermediário. Este *setup* não é o ideal uma vez que pode induzir a erros no espectro e torná-los instáveis, porém, esta experiência tem como único propósito averiguar a origem do pico secundário, não afetando qualquer resultado.



**Figura 26.** Espectro do laser CPS532 a 20°C, adquirido sem intermédio da fibra ótica.

Como é possível observar, o pico secundário a cerca de 537 nm desapareceu por completo. Concluindo assim que o pico secundário não tem origem no laser, nem no equipamento, mas sim no *setup* efetuado utilizando a fibra ótica SMA905. Embora interfira com o espectro do laser, a utilização de uma fibra ótica para conduzir o sinal ao espectrómetro é crucial para garantir a reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados que queremos analisar. Para além disso, não vamos utilizar a fibra ótica para a aquisição dos espectros Raman, assim o pico gerado por esta interferência não vai afetar os espectros de urina. Por conseguinte, decidimos continuar a avaliação da influência da temperatura na gama espectral no laser utilizando o *setup* com a fibra ótica, anteriormente mostrado.

Desta forma, prosseguiu-se com a variação da temperatura de funcionamento do laser para 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Os espectros obtidos para estas temperaturas encontram-se no capítulo [Anexos](#). Para facilitar a análise dos resultados obtidos, elaborámos um gráfico que representa a variação da FWHM em função da temperatura de funcionamento do laser. Este gráfico permite a visualização da relação existente entre a temperatura do laser e a sua gama espectral.



**Figura 27.** Influência da temperatura de funcionamento do laser na FWHM do seu pico principal.

Ao contrário do que era esperado, a relação entre a temperatura de funcionamento do laser e a FWHM não é linear, diminuindo até aos 30°C e aumentando até aos 40°C, onde atinge o seu valor máximo. À temperatura de 40°C, que corresponde à temperatura máxima de funcionamento do laser, observa-se uma instabilidade no formato do pico principal e uma redução significativa da sua intensidade, atingindo um valor de 0,51. Estes resultados indicam um impacto negativo no desempenho do laser a altas temperaturas, sugerindo que operar o laser **CPS532** nestas condições deve ser evitado. Por outro lado, a 30°C o valor de FWHM do pico principal atinge o seu valor mínimo de 649,8 pm, com uma intensidade aceitável de 0,82. Posto isto, concluímos que a temperatura que minimiza a gama espectral e que, consequentemente, irá aumentar a resolução espectral dos espectros Raman, é 30°C.

Numa segunda fase, adquiriu-se o espectro Raman do álcool Etanol (Fórmula química:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) com o sistema desenvolvido, a 3 temperaturas diferentes. O principal objetivo desta segunda fase foi compreender como é que a temperatura de funcionamento do laser influencia a qualidade e precisão dos espectros Raman. As temperaturas estudadas foram 25°C, 30°C e 35°C. Com base nos resultados da fase anterior, percebemos que a temperatura de 40°C pode ser prejudicial para o funcionamento do laser e, por esta razão, optámos por não obter o espectro do etanol a esta temperatura. Da mesma forma, a FWHM do pico do laser adquirido a 20°C foi elevada em comparação com os outros 3 espectros, portanto também decidimos não adquirir o espectro Raman a esta temperatura.

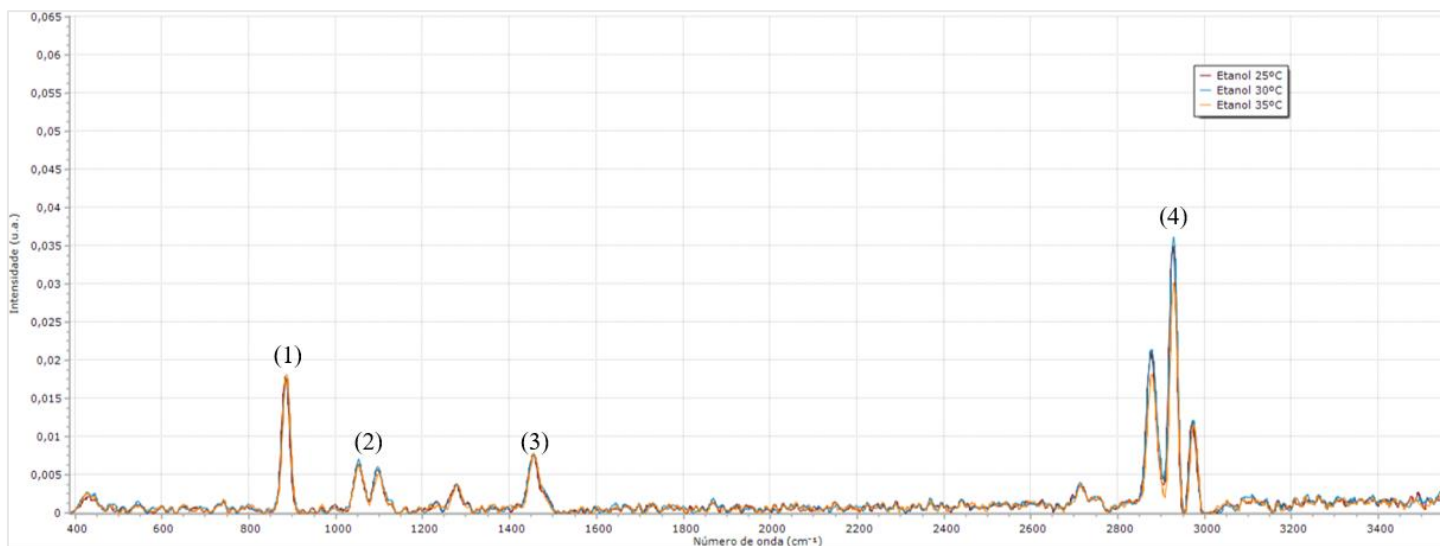
Antes de prosseguir com a aquisição dos espectros do etanol, foi necessário reajustar a gama espectral da câmara, uma vez que notamos que poderíamos perder informações importantes se limitássemos a gama a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Portanto, realizou-se novamente o ajuste do ângulo do filtro *edge-pass*, desta vez para limitar a gama espectral da câmara a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Depois do reajuste, recalibrou-se o sistema Raman e prosseguiu-se com a otimização.

Os espectros de etanol foram adquiridos com o *software* **Spectrum Analyzer** e utilizaram-se os seguintes parâmetros de aquisição:

**Tabela 10.** Parâmetros de aquisição utilizados para a aquisição dos espectros de etanol.

Tempo de Exposição (s)	Ganho (dB)	ROI (px)	Número médio de imagens
31,6	11,5	128	3

A visualização dos espectros obtidos foi realizada utilizando o programa **SpectraGryph**, na versão 1.2.



**Figura 28.** Espectro Raman do etanol a temperaturas de funcionamento do laser de 25°C, 30°C e a 35°C.

Para realizar uma análise completa dos espectros obtidos é essencial fornecer algum contexto acerca da molécula etanol e dos seus picos Raman caraterísticos, que já foram amplamente estudados. O etanol é uma molécula da família dos álcoois, composto apenas por ligações simples. O etanol tem os seus picos Raman caraterísticos a cerca de  $880\text{ cm}^{-1}$ , vibração referente ao alongamento da ligação C-C (1), a cerca de  $1050\text{ cm}^{-1}$ , vibração referente ao alongamento da ligação C-O (2), a cerca de  $1450\text{ cm}^{-1}$ , vibração referente à deformação da ligação C-H<sub>3</sub> (3) e 3 picos distintos entre  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  referentes ao alongamento das ligações C-H<sub>3</sub> e C-H<sub>2</sub> (4). [51]

Neste ponto, gostaríamos de salientar o facto de todos os picos Raman caraterísticos do etanol serem visíveis nos espectros obtidos, por si só é um sinal positivo quanto ao funcionamento e calibração do nosso sistema. A presença clara destes picos, ainda que pouco intensos, indica que o sistema está a operar com a precisão necessária para captar o sinal das vibrações moleculares do etanol.

Passando para a comparação dos 3 espectros do etanol obtidos, conseguimos observar que o espectro adquirido a 35°C possui a menor intensidade dos picos, principalmente na zona (4), a cerca de  $2800$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Comparando os espectros obtidos a 25°C e 30°C, observou-se que a intensidade dos picos adquiridos a 25°C é ligeiramente menor. No entanto, as diferenças entre estes dois espectros são quase impercetíveis. Considerando que, na primeira fase de otimização, a temperatura de funcionamento que potenciou o desempenho do laser foi 30°C e analisando o espectro de etanol adquirido a esta temperatura, concluímos 30°C é a temperatura que maximiza a eficiência global do sistema desenvolvido.

### 3.4.2. Parâmetros de aquisição do *software* Spectrum Analyzer

Os parâmetros de aquisição do *software* de recolha de dados desempenham um papel crucial na qualidade dos espectros obtidos. A otimização do tempo de exposição, do ganho e do número médio de imagens é fundamental para garantir a estabilidade dos resultados e a obtenção de espectros de qualidade com uma alta relação SNR.

A presente otimização será dividida em 3 fases, onde será analisado o impacto de cada parâmetro de aquisição na qualidade dos espectros de etanol. O único parâmetro que não será analisado é o ROI que, como referido anteriormente, se manteve fixo em 128 pixéis. Em todas as fases, os espectros serão obtidos com o laser a operar na temperatura previamente otimizada de 30°C.

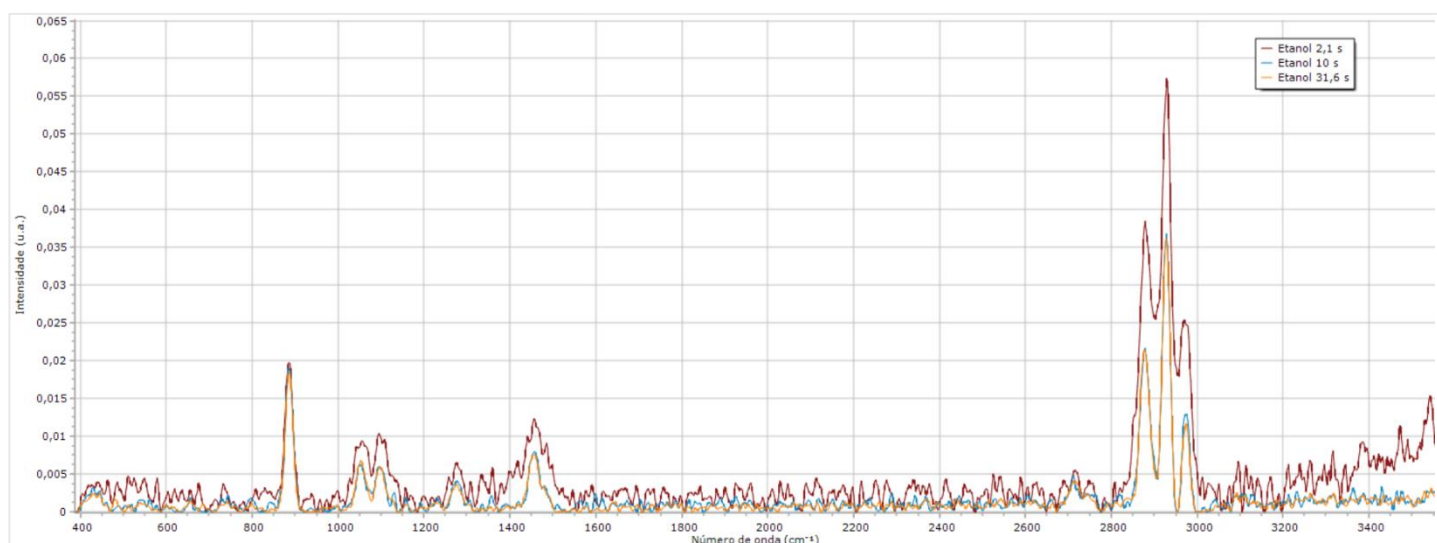
#### 1) Estudo da influência do Tempo de Exposição na qualidade do espectro Raman

O primeiro parâmetro a ser estudado foi o tempo de exposição. Para isto, capturou-se o espectro do etanol com 3 tempos de exposição diferentes, mantendo os restantes parâmetros de aquisição constantes. Os parâmetros utilizados encontram-se descritos na tabela abaixo.

**Tabela 11.** Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do tempo de exposição na qualidade do espectro Raman de etanol.

Nome	Tempo de exposição (s)	Ganho (dB)	Número médio de imagens
<b>Etanol 2,1 s</b>	2,1	3,8	2
<b>Etanol 10 s</b>	10	3,8	2
<b>Etanol 31,6 s</b>	31,6	3,8	2

É importante destacar que o tempo de exposição de 31,6 segundos corresponde ao limite máximo permitido pelo *software*. Também queremos salientar que foram adquiridos espectros com um tempo de exposição inferior a 2,1 segundos, porém estes apresentaram um elevado nível de ruído, o que tornava a sua análise exaustiva e confusa. A **Figura 29** contempla os 3 espectros de etanol obtidos.



**Figura 29.** Impacto do tempo de exposição na qualidade do espectro Raman de etanol.

O tempo de exposição mais curto, de 2,1 s, gerou um espectro Raman com elevado ruído, o que já era esperado. O ruído existente acaba por se incorporar nos picos Raman do etanol, aumentando a sua intensidade. Porém, como este aumento só acontece devido à adição de ruído, a correta análise do espectro fica comprometida. O nível de ruído reduziu de forma considerável quando se aumentou o tempo de exposição para 10 s. Esta observação vem de encontro ao que era esperado, uma vez que um maior tempo de aquisição permite que a câmara capte mais sinais úteis, minimizando o ruído. Por sua vez, o aumento do tempo de aquisição para o seu valor máximo, 31,6 s, causou diferenças subtis no ruído, particularmente visíveis na faixa entre cerca de 1500  $\text{cm}^{-1}$  até 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Embora a seleção de um tempo de exposição mais longo não tenha trazido melhorias significativas ao espectro de etanol, esta escolha pode ser vantajosa na análise dos espectros de urina, que tendem a apresentar um elevado nível de ruído. Portanto, aumentar o tempo de exposição para o seu limite máximo de 31,6 pode ajudar a captar sinais mais subtis do espectro de urina e melhorar a relação sinal-ruído. No entanto, é essencial prestar cuidadosa atenção quanto à possibilidade de saturação dos espectros ao usar tempos de exposição prolongados. No caso do espectro obtido, o espectro não ficou saturado, o que demonstra que o sistema é capaz de lidar com estes valores elevados de exposição, sem comprometer a integridade dos dados. Desta forma, e pensando nas futuras análises de urina, concluímos que o tempo de exposição que melhora a qualidade dos espectros Raman é 31,6 s.

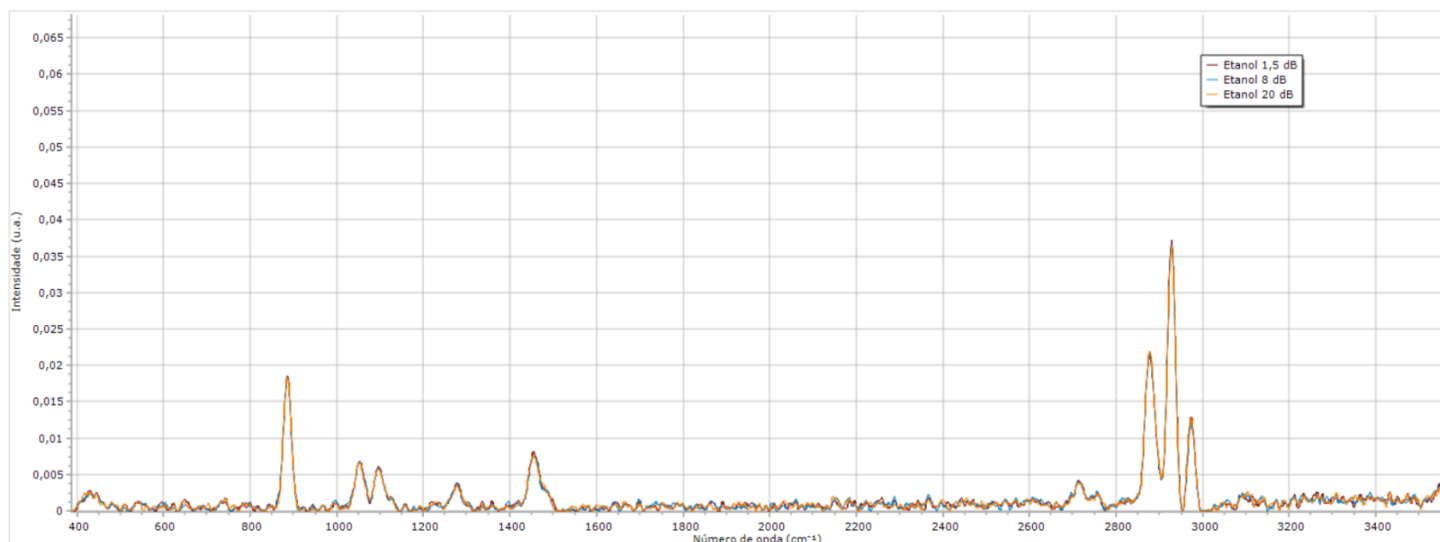
## 2) Estudo da influência do ganho na qualidade do espectro Raman

De seguida, estudou-se a influência do ganho na qualidade do espectro Raman do etanol. O espectro do etanol foi obtido com 3 valores de ganho diferentes, mantendo os restantes parâmetros de aquisição constantes. Os parâmetros utilizados encontram-se descritos na tabela abaixo.

**Tabela 12.** Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do ganho na qualidade do espectro de etanol.

Nome	Tempo de exposição (s)	Ganho (dB)	Número médio de imagens
<b>Etanol 1,5 dB</b>	31,6	1,5	2
<b>Etanol 8 dB</b>	31,6	8	2
<b>Etanol 20 dB</b>	31,6	20	2

Uma observação importante a notar é que tentámos adquirir o espectro com um ganho superior a 20 dB, porém a partir dos 2900  $\text{cm}^{-1}$  o espectro ficou saturado, tornando-se impossível retirar qualquer conclusão. Nesta faixa, os picos existentes apresentam uma intensidade elevada e, com o aumento do ganho, o sinal e o ruído existente são amplificados ainda mais, levando à saturação do espectro nesta região. Portanto, é necessário controlar o valor do ganho e não o aumentar excessivamente, para evitar a saturação.



**Figura 30.** Impacto do ganho na qualidade do espectro Raman de etanol.

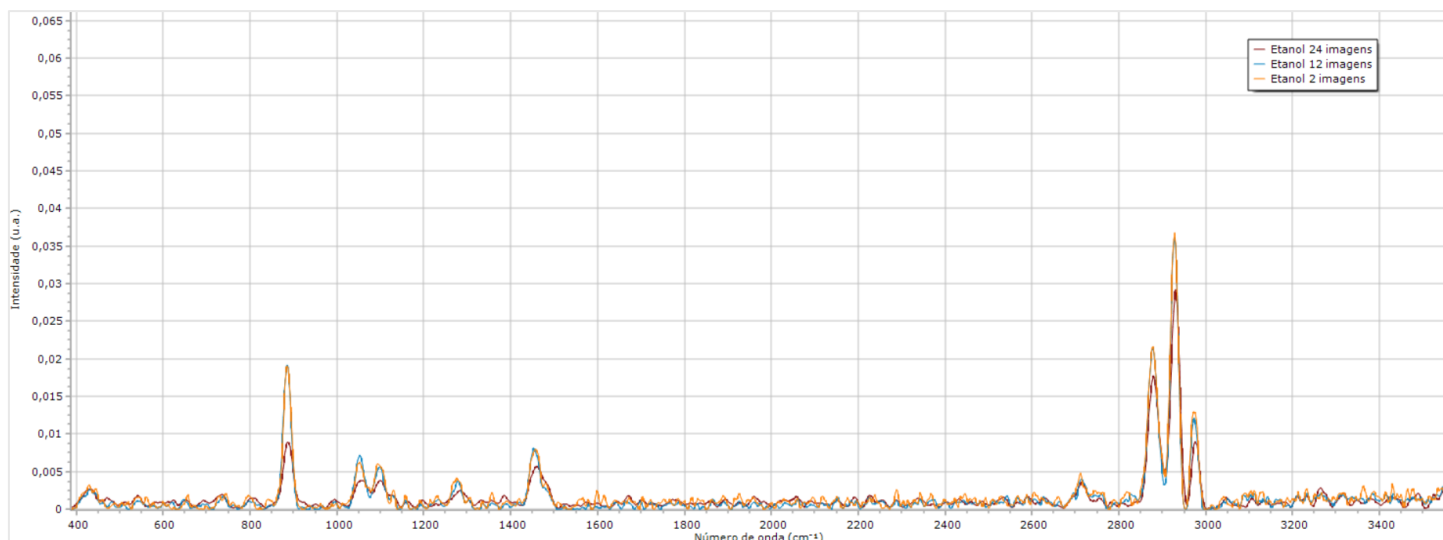
Como é possível observar, não existem diferenças notórias entre os espectros obtidos com diferentes níveis de ganho. Embora o aumento do ganho tenha gerado um acréscimo do nível de ruído em algumas regiões do espectro, a variação não é suficientemente clara para se retirar conclusões significativas. Dado que os espectros de etanol não apresentaram variações significativas em relação ao ganho, recomenda-se que esta análise seja repetida quando na fase de aquisição dos espectros de urina. A urina apresenta um espectro Raman mais complexo e com um nível de ruído mais elevado, onde o impacto do ganho poderá ser mais evidente. De uma forma geral, um ganho menor torna o espectro mais claro e menos ruidoso, porém apenas com a análise do espectro de etanol não é possível retirar conclusões concretas.

### 3) Estudo da influência do Número de imagens adquiridas na qualidade do espectro Raman

Por fim, estudou-se a influência do número de imagens adquiridas na qualidade do espectro Raman do etanol. O espectro do etanol foi capturado utilizando 3 valores médios de imagens, mantendo os restantes parâmetros de aquisição constantes. Os parâmetros utilizados encontram-se descritos na tabela abaixo.

**Tabela 13.** Parâmetros de aquisição utilizados para estudar o impacto do número médio de imagens na qualidade do espectro de etanol.

Nome	Tempo de exposição (s)	Ganho (dB)	Número médio de imagens
<b>Etanol 2 imagens</b>	10	3,8	2
<b>Etanol 12 imagens</b>	10	3,8	12
<b>Etanol 24 imagens</b>	10	3,8	24



**Figura 31.** Impacto do número médio de imagens na qualidade do espectro Raman de etanol.

Ao analisar os espectros obtidos é possível observar que ao adquirir apenas 2 imagens, o ruído é consideravelmente maior, principalmente nas regiões do espectro onde não há picos. Este ruído dificultará a análise de espectros mais complexos, como os de urina. Aumentando o número de imagens para 12, o nível de ruído nestas regiões diminui consideravelmente, enquanto os picos caraterísticos do etanol continuam com uma intensidade relativamente alta. Este número de imagens é o que oferece uma maior relação SNR, uma vez que minimiza o ruído mantendo os picos caraterísticos do etanol fortes e distintos. Ao adquirir um espectro com um maior número de imagens, o nível de ruído nas regiões onde não há picos mantêm-se praticamente idêntico ao nível de ruído no espectro adquirido com 12 imagens. Porém, a intensidade dos picos é reduzida consideravelmente. Portanto, concluímos que o número médio de imagens que melhora a qualidade geral do espectro, mantendo uma alta relação SNR, são 12 imagens.

## 4. Aquisição de espectros de urina com o sistema LUMINA

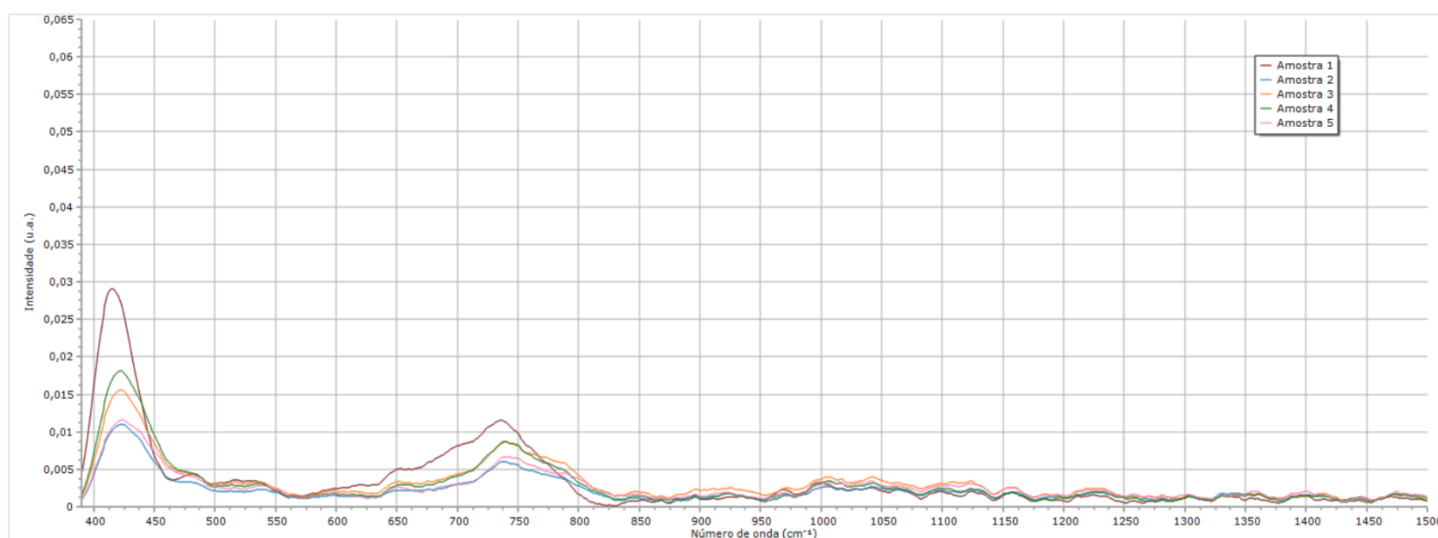
Para validar o sistema desenvolvido, no contexto da aquisição dos espectros de urina, é essencial avaliar o seu desempenho na análise destas amostras. O foco desta avaliação não será a identificação dos biomarcadores presentes na urina, nem a sua análise detalhada, será sim garantir que o sistema Raman é capaz de adquirir espectros de urina com a precisão e a consistência necessárias para futuras análises.

As 5 amostras utilizadas foram fornecidas pela NOVA Medical School. Os parâmetros de aquisição utilizados para os espectros encontram-se descritos na tabela abaixo.

**Tabela 14.** Parâmetros de aquisição utilizados para a aquisição dos espectros de urina.

Tempo de Exposição (s)	Ganho (dB)	ROI (px)	Número médio de imagens
31,6	1,5	128	10

A visualização dos espectros de urina obtidos foi realizada utilizando novamente o programa **SpectraGryph**, na versão 1.2.



**Figura 32.** Espectro Raman das 5 amostras de urina fornecidas pela NOVA Medical School.

Ao analisar os espectros obtidos é possível observar que todos apresentam picos consistentes em torno de  $415\text{ cm}^{-1}$  e a  $735\text{ cm}^{-1}$ . Na faixa dos  $900\text{ cm}^{-1}$  até cerca de  $1200\text{ cm}^{-1}$ , também se observa um pico de menor intensidade com uma gama mais ampla. As intensidades destes picos variam entre as amostras, demonstrando que o sistema é sensível às diferentes concentrações dos compostos presentes na urina e que é consistente na aquisição dos vários espectros. No entanto, a intensidade geral dos picos permanece relativamente baixa, com ruído presente ao longo do espectro. Para melhorar a intensidade dos picos e reduzir o ruído, seria necessário a utilização de um laser com maior resolução espectral e potência.

Com esta análise, demonstramos que o sistema Raman desenvolvido é consistente nas suas aquisições e sensível às variações de concentração dos compostos presentes numa matriz complexa, como a urina. Estes resultados reforçam a capacidade do sistema em detetar alterações na urina, fundamental para a sua utilização em análises futuras.

## 5. Desenvolvimento da Rede de Aprendizagem Supervisionada

### 5.1. Aquisição dos dados para o treino e teste da rede de aprendizagem

Dentro do âmbito da presente dissertação, o desenvolvimento de uma rede de aprendizagem tem como finalidade avaliar a sua aplicabilidade na identificação de padrões em espectros Raman. Desta forma, pretendemos avaliar a possibilidade de treinar um modelo de aprendizagem que seja capaz de diferenciar e classificar espectros Raman. Futuramente, caso a rede se demonstre apta para identificar bandas específicas nos espectros Raman da urina, poderá contribuir para tornar o diagnóstico de doenças renais mais simples, rápido e eficaz.

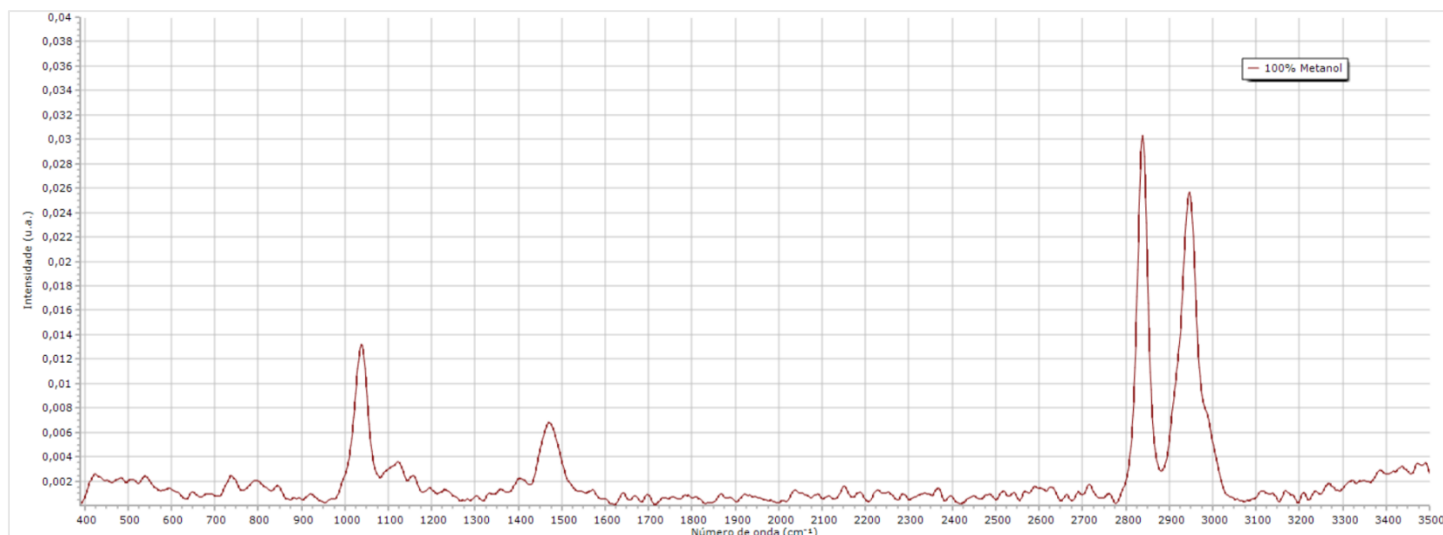
A etapa inicial para o desenvolvimento de uma rede de aprendizagem supervisionada consiste na aquisição dos dados. Posto isto, procedeu-se à aquisição dos espectros Raman de 6 soluções com diferentes composições de metanol e etanol. Entre cada espectro variou-se os parâmetros de aquisição do *software Spectrum Analyzer*, de modo a conseguirmos o maior número de dados possível. Os parâmetros alterados entre cada aquisição foram o tempo de exposição, o ganho e o número médio de imagens. Totalizando todos os espectros adquiridos, obteve-se 619 imagens. Como temos relativamente poucos dados, iremos dividi-los em apenas 2 conjuntos, o conjunto de treino e o conjunto de teste.

Na **Tabela 15** apresentamos as soluções de álcool utilizadas, o número de espectros obtidos para cada uma das misturas e o número total de espectros obtidos.

**Tabela 15.** Dados utilizados para a rede de aprendizagem supervisionada.

Soluções	Nº Espectros Obtidos	Nº Total de Dados
100% Etanol	106	618
100% Metanol	102	
20% Etanol 80% Metanol	102	
50% Etanol 50% Metanol	102	
80% Etanol 20% Metanol	103	
90% Etanol 10% Metanol	103	

A título de exemplo, apresentaremos em seguida um dos espectros Raman da solução 100% Metanol. Os espectros das restantes soluções de álcool encontram-se no capítulo [Anexos](#), exceto o espectro da solução 100% Etanol, uma vez que este já foi previamente analisado no **subcapítulo 3.4.2**.



**Figura 33.** Espectro Raman da solução 100% Metanol.

Depois da obtenção dos dados, a sua organização adequada é essencial para garantir a eficácia do treino e funcionamento da rede. Para tal, foram criadas 6 pastas, cada uma identificada consoante a classificação das soluções utilizadas. Os espectros obtidos foram então organizados e armazenados nestas pastas, de acordo com a sua solução. Esta organização permite informar a rede sobre o número e designação das classificações disponíveis, possibilitando que cada espectro seja associado à sua classe. Para o desenvolvimento da rede de aprendizagem utilizou-se o *software* **MATLAB**.

## 5.2. Descrição do processo para o desenvolvimento da rede

Neste subcapítulo, vamos descrever o processo seguido para o desenvolvimento do código do modelo de aprendizagem em **MATLAB**. Para facilitar o entendimento dos passos seguidos, iremos dividir o desenvolvimento da rede nas suas principais etapas.

Todo o desenvolvimento da rede de aprendizagem foi realizado com o auxílio de uma rede previamente desenvolvida pelo orientador Alessandro Fantoni, complementada com o uso de uma ferramenta de inteligência artificial. O entendimento de cada função e ferramenta do **MATLAB** foi conseguido através da leitura dos conteúdos de suporte, disponíveis no *site* do programa. Em conjunto, todos estes suportes foram fundamentais para orientar o processo de desenvolvimento da rede e garantir que as escolhas, tanto de arquitetura como dos parâmetros, fossem realizadas de forma eficiente e adequada.

### 1) Carregamento e preparação dos dados para serem utilizados pela rede

Primeiramente, carregou-se os dados para serem utilizados pela rede, através da criação da variável *inputfolder*, que representa o caminho para a diretoria onde se encontram os dados, e da função *fullfile*, que indica que toda a informação presente nesta diretoria será utilizada. Neste caso, a diretoria onde foram colocados os dados tem o seguinte caminho “ D:\Catarina Domingos\Dados para Rede de Aprendizagem”.

De seguida, utilizou-se a função *imageDatastore* para criar um repositório, denominado pela variável *imds*. Este repositório foi estruturado com base nas pastas que representam cada classe ou rótulo e tem como objetivo facilitar a leitura e o processamento dos dados. A opção *IncludeSubfolders* a *true* garante que todas as imagens presentes nas subpastas sejam carregadas para o **MATLAB** e as opções *LabelSource* e *foldernames* permite que os rótulos das imagens sejam extraídos diretamente dos nomes das pastas.

A função `countEachLabel` é facultativa, contudo foi adicionada de forma a informar o utilizador do número de imagens que existem em cada classe, mostrando a tabela representada na **Figura 35**.

Para utilizar como referência mais tarde, criou-se a variável `NClasses`, que indica o número de classificações possíveis para os dados, neste caso, são possíveis 6 classes.

```

1 %Rede Aprendizagem Supervisionada - Dissertação de Mestrado em Eng. Biomédica 2024
2 %Catarina Domingos
3
4
5 %Carregamento e preparação dos dados para serem utilizados pela rede
6
7
8 inputfolder=fullfile("D:\Catarina Domingos\Dados para Rede de Aprendizagem"); %Diretoria onde se encontram os dados
9
10 imds = imageDatastore(inputfolder,"Includesubfolders",true,"LabelSource","foldernames"); %Repositório das imagens e extração das suas classes
11
12 countEachLabel(imds) %Número de imagens dentro de cada classe
13
14 NClasses=6; %Número de classes possíveis
15

```

**Figura 34.** Código desenvolvido para o carregamento e preparação dos dados para serem utilizados pela rede de aprendizagem.

ans = 6x2 table

	Label	Count
1	100% Etanol	106
2	100% Metanol	102
3	20% Etanol 80% Metanol	102
4	50% Etanol 50% Metanol	102
5	80% Etanol 20% Metanol	103
6	90% Etanol 10% Metanol	103

**Figura 35.** Tabela mostrada ao utilizador, resultante da função `countEachLabel(imds)`.

O passo seguinte envolveu a divisão dos dados em conjuntos de treino e teste. Para isso, aplicou-se a função `splitEachLabel` no repositório `imds`. Esta função permite separar os dados de cada classe em dois subconjuntos: um para o treino da rede (`ImdsTraining`) e outro para o teste da rede (`ImdsTest`). Em cada classe, os dados foram divididos de forma aleatória e de maneira a que 80% das imagens fossem alocadas ao conjunto de treino e os restantes 20% ao conjunto de teste. Esta proporção foi escolhida para garantir que a rede tem uma quantidade suficiente de dados para realizar a sua aprendizagem durante a fase de treino, e que, ao mesmo tempo, é preservado um subconjunto representativo para avaliar a sua performance.

Adicionaram-se, novamente, as funções facultativas `countEachLabel` com o objetivo de informar o utilizador do número de imagens que existem em cada conjunto e classe. As tabelas derivadas nestas funções encontram-se na **Figura 37**.

```

16 [ImdsTraining,ImdsTest] = splitEachLabel (imds, 0.8,'randomized'); %Divisão dos dados no conjunto de treino (80%) e no conjunto de teste (20%)
17
18 countEachLabel (ImdsTraining) %Número de imagens do conjunto de treino, dentro de cada classe
19
20 countEachLabel (ImdsTest) %Número de imagens do conjunto de teste, dentro de cada classe
21
22

```

**Figura 36.** Código desenvolvido para a divisão dos dados no conjunto de treino e de teste.

ans = 6x2 table			ans = 6x2 table		
	Label	Count		Label	Count
1	100% Etanol	85	1	100% Etanol	21
2	100% Metanol	82	2	100% Metanol	20
3	20% Etanol 80% Metanol	82	3	20% Etanol 80% Metanol	20
4	50% Etanol 50% Metanol	82	4	50% Etanol 50% Metanol	20
5	80% Etanol 20% Metanol	82	5	80% Etanol 20% Metanol	21
6	90% Etanol 10% Metanol	82	6	90% Etanol 10% Metanol	21

**Figura 37.** Tabelas mostradas ao utilizador, resultantes da função *countEachLabel(imdsTraining)* e *countEachLabel(imdsTest)*, respetivamente.

## 2) Desenvolvimento da arquitetura da rede

Neste ponto, procedeu-se à definição e desenvolvimento da arquitetura da rede, começando pela camada de entrada, seguida das camadas ocultas e, por último, a camada de saída.

As camadas da rede foram programadas dentro da variável *layers*. A primeira camada a ser definida na rede é a de entrada, configurada com a função *imageInputLayer*, função responsável por fornecer à rede as imagens 2D que irão ser utilizadas. Para configurar corretamente esta camada, é necessário especificar o tamanho dos dados de entrada, ou seja, a altura e largura das imagens, e o número de canais de cor presentes em cada imagem. No nosso caso, as imagens adquiridas possuem todas o mesmo tamanho, 1000 px de altura e 2000 px de largura. Caso as imagens não fossem do mesmo tamanho, teríamos de as redimensionar previamente, de forma garantir uniformidade dos dados. As imagens utilizadas seguem o código de cores RGB, por isso possuem 3 canais de cor.

Após introdução das especificações das imagens de entrada, prosseguiu-se para a definição da primeira camada de convolução. As camadas de convolução para imagens 2D são configuradas através da função *convolution2dLayer*. Para utilizar esta função, é necessário informar a rede de quanto filtros convolucionais serão aplicados às imagens e qual o tamanho dos mesmos. Para a primeira camada convolucional escolheu-se utilizar 8 filtros com tamanho 5x5.

Para a criação de uma camada de normalização *batch* e de uma camada de ativação *ReLU*, utilizaram-se as funções *batchNormalizationLayer* e *reluLayer*, respetivamente. A camada de *pooling* foi configurada utilizando a função *maxPooling2dLayer*. Para configuração desta camada é necessário definir o tamanho da janela do *pooling* e a forma como esta janela se irá mover pelos dados, este parâmetro é facultativo, porém vamos utilizá-lo. Como tamanho da janela de *pooling* definimos uma matriz 2x2 e definimos *Stride* de 2 como a maneira de movimentação da janela pela imagem. Um *Stride* de 2 significa que cada janela de *pooling* se move 2 pixéis de cada vez, tanto horizontalmente quanto verticalmente.

Para a segunda camada convolucional optou-se por utilizar 16 filtros de dimensões 7x7, de forma a garantir que todos os detalhes da imagem são absorvidos pela rede. Adicionou-se uma camada de normalização *batch*, de função de ativação *ReLU* e uma camada de *pooling*, adicionadas da mesma forma que foi descrita anteriormente.

As últimas camadas a serem definidas são as camadas de saída, que desempenham um papel crucial na classificação final dos dados. A primeira camada deste conjunto de saída é configurada através da função *fullyConnectedLayer*. Esta camada, totalmente conetada, é responsável por ajustar o número de neurónios na última camada de rede, de forma a corresponder ao número de classes presentes no conjunto dos dados. O número de classes é determinado pela variável *NClasses*, anteriormente definida. Após a camada totalmente conetada, são adicionadas mais duas camadas, a camada de função de ativação *softmax* e uma camada de classificação, configuradas pelas funções *softmaxLayer* e

*classificationLayer*, respetivamente. A função *softmax* converte as saídas da rede em probabilidades de classificação e a função *classificationLayer* utiliza estas probabilidades para classificar cada dado de entrada, concluindo assim o processo de classificação.

```

26
27 layers = [
28     imageInputLayer([1000 2000 3]) %Camada de entrada para imagens com dimensão 1000 x 2000 e com 3 canais de cor (RGB)
29
30     convolution2dLayer(5,8) %Primeira camada de convolução com 8 filtros de dimensão 5x5
31     batchNormalizationLayer %Normalização batch
32     reluLayer %Função de ativação ReLU
33
34     maxPooling2dLayer(2,'Stride',2) %Camada de pooling com filtro com dimensão 2x2
35
36     convolution2dLayer(7,16) %Segunda camada de convolução com 16 filtros de dimensão 7x7
37     batchNormalizationLayer %Normalização batch
38     reluLayer %Função de ativação ReLU
39
40     maxPooling2dLayer(2,'Stride',2) %Camada de pooling com filtro com dimensão 2x2
41
42     fullyConnectedLayer(NClasses) %Camada de saída com 6 neurónios
43     softmaxLayer %Função de ativação softmax
44     classificationLayer %Camada de classificação
45 ];
46

```

**Figura 38.** Código desenvolvido para definir a estrutura e as várias camadas da rede de aprendizagem.

### 3) Configuração dos hiperparâmetros para o treino da rede

Os hiperparâmetros são atributos que controlam o processo de treino da rede de aprendizagem. Estes parâmetros desempenham um papel essencial no desempenho da rede, influenciando a rapidez e precisão do treino. Ao ajustar estes parâmetros é possível otimizar o treino da rede e torná-la mais robusta, melhorando a sua eficiência e capacidade de generalização.

Os hiperparâmetros foram configurados dentro variável *options*, através da função *trainingOptions*, utilizada para definir as opções de treino da rede. Dentro desta função, o primeiro parâmetro a ser definido é o algoritmo de otimização. Dentro das várias opções de algoritmos disponíveis, optou-se por seleccionar o algoritmo *sgdm* (Stochastic Gradient Descent With Momentum). Após a configuração do algoritmo seleccionado, passamos à configuração dos hiperparâmetros.

Para uma melhor compreensão da importância de cada hiperparâmetro utilizado, iremos entrar em detalhe sobre cada um deles. Começando pelo hiperparâmetro *MaxEpoch*, este define o número máximo de vezes que o ciclo de treino, denominado como *epoch*, é repetido. A otimização deste parâmetro é de extrema importância, uma vez que o número de *epochs* determina a eficácia e a capacidade de ajuste do modelo. Quanto maior o número de *epochs*, mais o modelo consegue aprender com os dados de treino, porém mais tempo irá demorar a apresentar resultados e ocorre o risco de *overfitting*.

Durante um *epoch*, o modelo processa todos os dados do conjunto de treino e atualiza os seus parâmetros de peso e *bias*, com base no erro cometido em cada previsão. No início de cada *epoch*, os dados são divididos em *mini-batches*, que são subconjuntos do conjunto de treino. Durante o *epoch*, o modelo faz previsões com base nos dados de entrada de cada *mini-batch*, calcula a diferença entre as previsões do modelo e a verdadeira classificação (função de perda) e utiliza esta função de perda para recalcular o peso de cada entrada. O tamanho do *mini-batch* também é considerado um hiperparâmetro de treino, uma vez que *mini-batches* maiores podem resultar num tempo de treino superior. O tamanho dos *mini-batches* é dado pelo parâmetro *miniBatchSize*.

O hiperparâmetro *InitialLearnRate* define a taxa de aprendizagem na qual a rede irá ajustar os seus pesos durante o treino. Esta taxa influencia diretamente a velocidade e a eficácia do processo de treino, uma vez que se a taxa não for devidamente ajustada pode impedir a rede de convergir e aprender com os dados de treino ou tornar o treino demasiado demorado.

O comando *Shuffle* baralha os dados do conjunto de treino à frequência requisitada. Neste caso, os dados serão baralhados a cada *epoch*.

A ativação do comando *Verbose* possibilita a visualização de uma tabela com os detalhes de cada *epoch*. Monitorizando os detalhes da rede entre cada *epoch* é possível a avaliação do progresso do modelo e da necessidade, ou não, do ajuste dos hiperparâmetros.

O valor dos hiperparâmetros podem, e devem, ser ajustados iterativamente ao longo do desenvolvimento da rede, de modo a avaliar a forma como impactam a precisão e exatidão da rede. Inicialmente, definiu-se os seguintes valores para cada hiperparâmetro:

- *MaxEpoch*: 20;
- *InitialLearnRate*: 0,001;
- *MiniBatchSize*: 64.

```
47
48 %Configuração dos hiperparâmetros do treino da rede
49
50
51 options = trainingOptions("sgdm", ... %Algoritmo de otimização SGDM
52 "MaxEpochs",20, ... %Número de Epochs
53 "InitialLearnRate",0.001, ... %Taxa de aprendizagem
54 'MiniBatchSize', 64,... %Tamanho de cada mini-batch
55 "Shuffle","every-epoch", ... %Baralha os dados a cada Epoch
56 "Verbose", true); %Ativa a apresentação dos detalhes de cada Epoch
57
```

**Figura 39.** Código desenvolvido para configurar os hiperparâmetros do treino da rede.

#### 4) Treino da rede

Após a estruturação da rede e a configuração dos hiperparâmetros, procedeu-se ao treino da rede através do comando *trainNetwork*. A variável *imdsTraining* é o conjunto de imagens de treino, definida anteriormente. A rede irá ser treinada com este conjunto e terá a estrutura programada na variável *layers*. O treino da rede vai ser realizado com os valores dos hiperparâmetros indicados no passo anterior e definidos na variável *options*.

```
58
59 %Treino da rede
60
61
62 net = trainNetwork(IldsTraining, layers, options);
63
```

**Figura 40.** Código desenvolvido para treinar a rede.

#### 5) Avaliação da rede desenvolvida

O último passo é a avaliação do desempenho da rede, utilizando o conjunto de teste. A função *classify* realiza a classificação do conjunto de teste (*imdsTest*) com a rede de aprendizagem *net*, previamente treinada. A variável *YPred* armazena os rótulos previstos pela rede para cada imagem do conjunto de teste. Por sua vez, a variável *YReal* armazena os rótulos verdadeiros de cada imagem do conjunto de teste. Os rótulos verdadeiros são extraídos pelo comando *imdsTest.Labels*.

Com os rótulos previstos pela rede e os rótulos reais armazenados em variáveis podemos compará-las e determinar a precisão e a exatidão da rede. A exatidão, descrita com a variável *accuracy*, é calculada dividindo o número de previsões corretas pelo número total de imagens. O número de previsões corretas é dado pela expressão *sum(YPred == YReal)*. Esta expressão conta o número de vezes que o valor previsto pela rede iguala o valor real. Após a determinação da exatidão da rede, o valor é apresentado ao utilizador em percentagem, através da função *disp*.

A matriz de confusão foi efetuada a partir da função *confusionchart* e *confusionmat* utilizando os rótulos reais dos dados do conjunto de teste e os previstos pela rede. A matriz de confusão auxilia na visualização das previsões corretas e na identificação das classes que estão a ser confundidas pela rede.

De forma a tornar a matriz de confusão mais completa, adicionou-se o título “Matriz de Confusão” e identificou-se o eixo das abcissas como “Classificação Prevista” e o eixo das ordenadas como “Classificação Real”.

Por último, a precisão da rede é calculada pela média de vezes que a rede classificou corretamente os dados do conjunto de teste. A precisão de cada classe é obtida dividindo o número de previsões corretas pelo número de imagens pertencentes a essa classe. Assim, a precisão da rede é dada pela média da precisão individual de cada classe, que corresponde à média dos valores nominais da diagonal da matriz de confusão.

```
64
65 %Avaliação da rede
66
67
68 YPred = classify(net,ImdsTest);           %Classificação das imagens do conjunto de teste previsto pela rede
69 YReal = ImdsTest.Labels;                %Classificação real das imagens do conjunto de teste
70
71
72 accuracy = sum(YPred == YReal)/numel(YReal); %Cálculo da exatidão da rede
73
74 accuracyPercentage = accuracy * 100;
75
76 disp(['Exatidão: ', num2str(accuracyPercentage), '%']) %Apresentação da exatidão em percentagem
77
78
79 figure(1)                                %Realização da matriz de confusão
80
81 confusionMat = confusionchart(YReal, YPred);
82 confusionMat = confusionmat(YReal, YPred);
83 confusionMat=bsxfun(@rdivide,confusionMat,sum(confusionMat,2));
84
85 title('Matriz de Confusão')
86 xlabel('Classificação Prevista')
87 ylabel('Classificação Real')
88
89 precision = mean(diag(confusionMat));      %Cálculo da precisão da rede
90
91 precisionPercentage = precision * 100;
92
93 disp(['Precisão: ', num2str(precisionPercentage), '%']) %Apresentação da precisão da rede em percentagem
```

**Figura 41.** Código desenvolvido para avaliação da rede, através do cálculo da exatidão e da precisão da rede e da realização da matriz de confusão.

### 5.3. Otimização da rede de aprendizagem desenvolvida

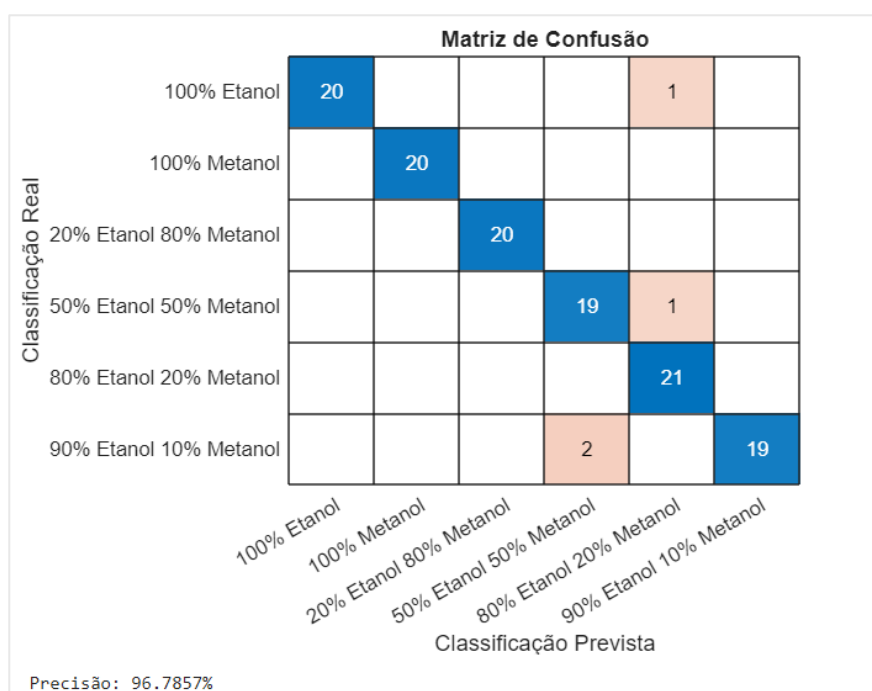
Após o desenvolvimento do código, vamos prosseguir com a otimização dos hiperparâmetros da rede. Correu-se a rede com os valores de hiperparâmetros inicialmente colocados: *MaxEpoch* de 20, taxa de aprendizagem 0,001 e tamanho de cada *mini-batch* 64. Os resultados obtidos e a matriz de confusão encontram-se nas figuras abaixo.

Epoch	Iteration	Time Elapsed (hh:mm:ss)	Mini-batch Accuracy	Mini-batch Loss	Base Learning Rate
1	1	00:00:11	10.94%	3.1782	0.0010
8	50	00:08:40	43.75%	1.5432	0.0010
15	100	00:17:16	98.44%	0.0513	0.0010
20	140	00:24:04	100.00%	0.0053	0.0010

Training finished: Max epochs completed.

Exatidão: 96.748%

**Figura 42.** Detalhes de cada *Epoch*, tendo como hiperparâmetros de treino: *MaxEpoch* = 20, *InitialLearningRate* = 0,001 e *MiniBatchSize* = 64.



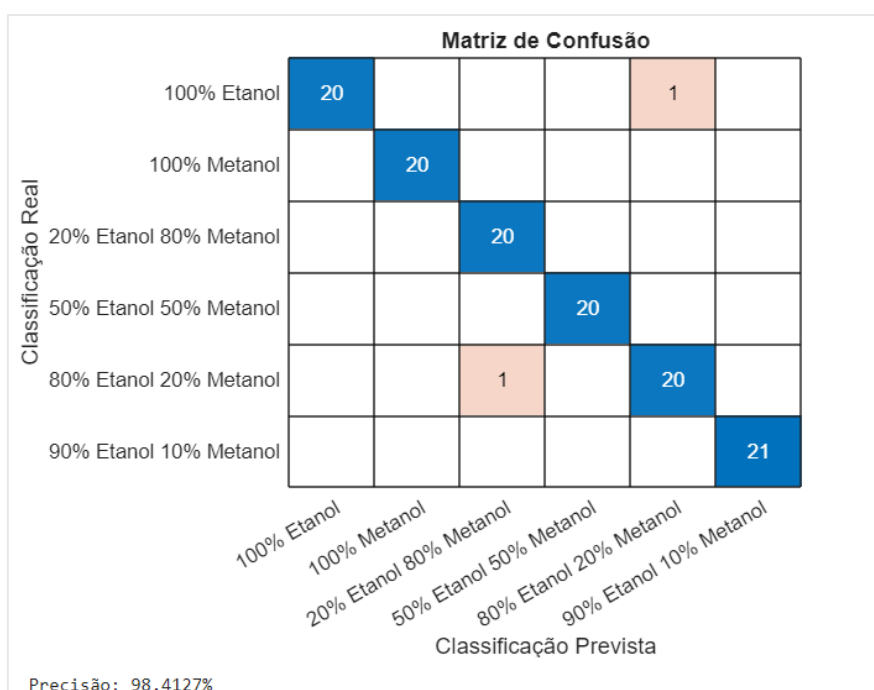
**Figura 43.** Matriz de confusão e precisão da rede, tendo como hiperparâmetros de treino: *MaxEpoch* = 20, *InitialLearningRate* = 0,001 e *MiniBatchSize* = 64.

Com estes valores, conseguimos alcançar uma exatidão de 96,75% e uma precisão 96,79%. O processo de treino da rede demorou cerca de 24 minutos, que é um tempo consideravelmente alto, tendo em conta os valores de exatidão e precisão. Posto isto, tentámos diminuir o tempo de treino e aumentar o desempenho da rede. Para isto, diminuámos o tamanho de cada *mini-batch* de 64 para 32, mantendo os outros hiperparâmetros iguais. Todos os resultados alcançados encontram-se nas figuras abaixo.

Epoch	Iteration	Time Elapsed (hh:mm:ss)	Mini-batch Accuracy	Mini-batch Loss	Base Learning Rate
1	1	00:00:02	9.38%	2.3688	0.0010
4	50	00:01:49	21.88%	1.7812	0.0010
7	100	00:03:39	96.88%	0.0497	0.0010
10	150	00:05:27	100.00%	0.0002	0.0010
14	200	00:07:15	100.00%	0.0002	0.0010
17	250	00:09:03	100.00%	6.9976e-05	0.0010
20	300	00:10:52	100.00%	1.8528e-05	0.0010

Training finished: Max epochs completed.  
Exatidão: 98.374%

**Figura 44.** Detalhes de cada *Epoch*, tendo como hiperparâmetros de treino: *MaxEpoch* = 20, *InitialLearningRate* = 0,001 e *MiniBatchSize* = 32.



**Figura 45.** Matriz de confusão e precisão da rede, tendo como hiperparâmetros de treino: *MaxEpoch* = 20, *InitialLearningRate* = 0,001 e *MiniBatchSize* = 32.

Alterando apenas este hiperparâmetro conseguimos aumentar a exatidão da rede para 98,37% e a precisão para 98,71% e reduzir o tempo de treino para cerca de 10 minutos. Com a diminuição do tamanho de cada *batch* para metade, o tempo de treino reduziu significativamente e o desempenho da rede aumentou 2%.

Continuámos a realizar esta análise alterando os hiperparâmetros de treino com o objetivo de otimizar tanto a exatidão e precisão da rede, como também o tempo de treino necessário. O resultado deste estudo encontra-se na **Tabela 16**.

**Tabela 16.** Análise da forma como a alteração dos hiperparâmetros impacta a avaliação da rede.

Hiperparâmetros de treino			Desempenho da Rede		
<i>MaxEpoch</i>	<i>InitialLearningRate</i>	<i>MiniBatchSize</i>	Exatidão (%)	Precisão (%)	Tempo de treino
20	0,001	64	96,75	96,79	24 min 04 s
20	0,001	32	98,37	98,71	10 min 52 s
20	0,001	16	100	100	05 min 31 s
30	0,001	16	99,19	99,21	08 min 20 s
10	0,001	16	99,19	99,21	02 min 45 s
20	0,1	16	17,07	16,67	05 min 28 s
20	0,01	16	87,81	87,78	05 min 30 s

Analisando os resultados obtidos, é evidente que o hiperparâmetro que mais impacta a exatidão e a precisão da rede é o *InitialLearningRate*. Quando aumentamos a taxa de aprendizagem de 0,001 para 0,01, observa-se uma diminuição do desempenho da rede. Ao aumentar ainda mais esta taxa para 0,1, a exatidão reduz drasticamente para 17,07% e a precisão para 16,67%. Isto acontece porque estas taxas de aprendizagem são demasiado altas para a nossa rede, fazendo com que os ajustes de peso da rede sejam demasiado elevados, impedindo que a rede aprenda os padrões dos dados de forma adequada. Posto isto, a taxa de aprendizagem que otimiza o desempenho da rede desenvolvida é 0,001.

Por sua vez, a redução do tamanho de cada *batch* de 32 para 16 maximizou o desempenho da rede. Diminuindo este hiperparâmetro, conseguimos alcançar 100% de exatidão e precisão, com um ciclo de aprendizagem que durou apenas cerca de 5 minutos.

Por último, o hiperparâmetro *MaxEpoch* não influenciou a rede conforme o esperado. Era espectável que com o aumento do número de ciclos *epoch* de 20 para 30 o desempenho da rede se mantivesse igual, aumentando apenas o tempo de treino. Porém, a exatidão e a precisão da rede diminuíram ligeiramente. Com a diminuição dos ciclos *epoch* de 20 o tempo de treino da rede teve o seu valor mínimo de cerca de 2 minutos.

Comparando todos os resultados, podemos concluir que os hiperparâmetros que maximizam o desempenho da rede, mantendo um tempo de treino aceitável são: *MaxEpoch* de 20, *InitialLearningRate* de 0,001 e *MiniBatchSize* de 16.

Concluindo, a rede de aprendizagem desenvolvida demonstrou potencial para ser aplicada na classificação de espectros Raman, evidenciando a sua capacidade para identificar padrões nestes espectros com precisão. Após otimização dos hiperparâmetros, a rede conseguiu atingir uma precisão e exatidão de 100%. A rede desenvolvida é pouco robusta e foi desenvolvida tendo poucos dados de treino, o que pode ter deturpado os valores de exatidão e precisão obtidos.

## 6. Discussão dos resultados

O processo de desenvolvimento do sistema Raman teve início na descrição dos principais componentes que o constituem. Os lasers são considerados a fonte de radiação ideal para a espectroscopia Raman, devido à sua alta intensidade e coerência. A escolha do modelo do laser a utilizar no presente sistema recaiu no seu preço, comprimento de onda e gama de emissão. O comprimento de onda do laser influencia a quantidade de fluorescência emitida pela amostra. Esta fluorescência interfere com os picos Raman e dificulta a interpretação dos espectros, desta forma, é essencial selecionar uma fonte de radiação com um comprimento de onda que minimize a fluorescência emitida pela amostra. Para isto, quantificou-se a fluorescência emitida pela urina, que irá ser a principal amostra analisada com o sistema desenvolvido, quando irradiada com radiação com diferentes comprimentos de onda. Utilizou-se o espectrofluorímetro **FP-8300**, da *JASCO Corp.* e irradiou-se a urina com três comprimentos de onda diferentes, 405 nm, 532 nm e 635 nm. Quando irradiada com um feixe com comprimento de onda de 532 nm, a urina emite fluorescência numa gama considerável, começando a 450 nm, com baixa intensidade, após o pico da radiação emitida pelo espectrofluorímetro, a 532 nm, a intensidade da fluorescência atinge o seu máximo e decresce rapidamente até cerca de 680 nm. Com este comprimento de onda, o sinal Raman é mais intenso, tendo sido considerado o comprimento de onda que tem o melhor compromisso entre a qualidade do espectro e a interferência da fluorescência. Os resultados de fluorescência obtidos indicam que a realização de análises Raman com fontes de radiação na zona do violeta, 405 nm, poderá não ser favorável uma vez que a gama de emissão de fluorescência pela urina quando irradiada com este comprimento de onda é extensa, ou seja, observa-se que grande parte dos componentes da urina emitem fluorescência a este comprimento de onda. Por outro lado, o comprimento de onda que minimiza a emissão de fluorescência pela urina é 635 nm, na zona vermelha do espectro eletromagnético. Porém, em comprimentos de onda maiores, a intensidade do sinal Raman é reduzida, o que pode dificultar a análise dos espectros. Apesar deste comprimento de onda não ter sido o utilizado, futuramente pode ser uma alternativa a explorar, utilizando um laser com uma potência elevada, para compensar o fraco sinal Raman.

O suporte escolhido para a amostra teve em conta a sua futura implementação num sistema de deteção trifásico, desta forma, foi necessário encontrar um suporte que permitisse a adaptação de diferentes métodos de deteção. Tendo isto em conta, escolheu-se o suporte **CVH100/M** da *Thorlabs*. Este suporte é compatível com diferentes tamanhos de cuvete e possui 4 entradas de luz, permitindo 2 caminhos de luz perpendiculares para medições de transmissão e fluorescência. Juntamente com o suporte são fornecidos um adaptador para fibras óticas SMA e 2 tampas, para serem colocadas nas entradas que não estão a ser utilizadas. Estas tampas e o próprio material do suporte, isolam completamente a amostra, evitando que a luz exterior interfira com as medições. O suporte **CVH100/M** dispõe igualmente de um suporte para lentes, com espessura até 7 mm, que se demonstrou útil para aumentar a qualidade dos espectros obtidos.

A seleção dos elementos óticos, como espelhos e dos filtros a utilizar, é uma etapa fundamental para assegurar a obtenção de espectros com alta qualidade e resolução. O percurso ótico do laser começa ao atingir o espelho direcional **PF10-03-G01**, sendo direcionado para o espelho dicróico **DMLP550**. A escolha deste espelho teve como base o seu comprimento de onda de corte. Neste caso, pretendemos que toda a radiação emitida pelo laser, com comprimento de onda na zona verde do espectro eletromagnético, atinja a amostra e que toda a radiação com um comprimento de onda diferente seja eliminada. Desta forma, selecionou-se um espelho dicróico com comprimento de onda de 550 nm, refletindo toda a radiação abaixo deste valor e transmitindo toda a radiação superior a este valor.

O filtro *edge-pass* foi igualmente selecionado de acordo com o seu comprimento de onda de corte. Este filtro remove toda a radiação não-Raman, com comprimento de onda inferior a 550 nm. Desta forma, selecionou-se o modelo **FELH0550**.

O deslocamento que o laser sofre depois de passar por estes elementos óticos é corrigido através da janela de compensação **WG11050-A**.

Depois do realinhamento do feixe, este é direcionado através de um conjunto de lentes acromáticas, **AC127-019-A** e **AC254-050-A**, que têm como função ajustar a direção e o perfil do feixe, e de uma fenda **S50K**, com 50  $\mu\text{m}$  de abertura. A regulação da abertura da fenda permite o controlo preciso da quantidade de radiação que passa para as etapas subsequentes do processo, impactando assim a resolução do detetor.

Antes de ser captada pelo detetor, o feixe é separado de acordo com o seu comprimento de onda pela rede de difração **GR25-1202**. Esta rede tem uma densidade de 1200 linhas por milímetro.

O detetor utilizado foi uma câmara *Blackfly GigE* da marca *FLIR*, modelo **BFLY-PGE-31S4M-C**. A escolha deste modelo fundamenta-se na sua total compatibilidade com o *software* de recolha dos dados utilizado, garantindo assim uma integração perfeita da câmara no sistema desenvolvido.

O *software* selecionado para a aquisição e extração dos espectros Raman foi o **Spectrum Analyzer**, disponibilizado oficialmente no site *OpenRAMAN*. Este *software* foi desenvolvido e otimizado especificamente para operar com o tipo de equipamento desenvolvido, minimizando assim o risco de incompatibilidades e divergências nos espectros obtidos com o nosso sistema. Além disto, trata-se de um *software* de livre acesso, disponível para uso com qualquer espectrómetro, que utilize uma câmara *PointGrey*. Outra das razões que fundamentou a escolha do **Spectrum Analyzer** é o facto deste *software* já ter sido previamente validado para utilização com o modelo de câmara escolhido, o que assegura a compatibilidade com o sistema desenvolvido.

O processo de alinhamento do sistema Raman foi dividido em 2 fases, a primeira teve como principal objetivo o alinhamento do feixe do laser com o eixo ótico do sistema. Este alinhamento ótico foi realizado através da regulação do ângulo e orientação do espelho direcional e do espelho dicróico. A segunda fase do alinhamento consistiu no alinhamento dos filtros, da fenda rotativa e da rede de difração, garantindo que a imagem capturada pela câmara está devidamente alinhada, tanto horizontalmente como verticalmente. Para este alinhamento, foi utilizada uma montagem de fibra ótica e de uma lâmpada fluorescente e o *software* **SpinView**. O modo “Crosshair” do *software* **SpinView** auxiliou no alinhamento das bandas obtidas, uma vez que coloca uma “mira” no centro *display*, que serviu como o nosso eixo de referência. Para alinhar as bandas com o eixo horizontal da “mira”, regulou-se o ângulo de incidência da rede de difração, através do ajuste dos reguladores presentes no seu suporte **KM100**. Por sua vez, para orientar as bandas de acordo com o eixo vertical da “mira”, ajustou-se a fenda rotativa **CRM1T/M**, regulando assim a percentagem de abertura da fenda.

A etapa seguinte foi o ajuste da gama espectral da câmara, utilizando a mesma lâmpada fluorescente utilizada no alinhamento como fonte de radiação. Esta etapa tem como objetivo remover os comprimentos de onda inferiores a 546,5 nm, limitando a gama do sensor a 500  $\text{cm}^{-1}$ . A gama é limitada através do filtro *edge-pass*. Mais tarde, tornou-se necessário repetir este processo de ajuste, para limitar a gama do sensor a 400  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que se denotou que podiam ser perdidas informações importantes no espectro da urina.

A calibração espectral da câmara foi efetuada diretamente com o *software* **Spectrum Analyzer**, com uma lâmpada Néon.

Para determinar qual a temperatura de funcionamento do laser que otimiza a resolução espectral do mesmo foram realizadas duas experiências distintas. Numa primeira fase, averiguou-se a influência da temperatura na largura à meia altura do pico do laser **CPS532**, utilizando uma montagem com a fibra ótica **SMA095** e o espectrómetro **CCS200/M**. Durante a aquisição do espectro do laser, denotou-se um pico secundário em torno do comprimento de onda 537 nm. Apesar deste pico possuir uma baixa intensidade, pode interferir com os espectros Raman e alterar os resultados obtidos. Desta forma tornou-se essencial averiguar a razão da sua existência e eliminá-lo. No site da *Thorlabs* não existia qualquer evidência da emissão deste pico secundário pelo laser **CPS532**, assim, resta-nos colocar a hipótese de

ser um pico derivado da fibra ótica. Para testar esta hipótese, realizou-se um estudo adicional, à temperatura de 20°C, no qual o feixe do laser foi focalizado diretamente no orifício de entrada de radiação do espectrômetro, sem a fibra ótica como intermédio. Este *setup* não é o ideal uma vez que pode induzir a erros no espectro e torná-los instáveis, porém, esta experiência tem como único propósito averiguar a origem do pico secundário, não afetando qualquer resultado. Sem o intermédio da fibra ótica, o pico secundário desapareceu por completo, confirmando assim que este pico era derivado da utilização da fibra. Embora interfira com o espectro do laser, nesta fase, a utilização de uma fibra ótica para conduzir o sinal ao espectrômetro é crucial de forma a garantir a reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados que queremos analisar. Posto isto, prosseguiu-se com as aquisições do espectro do laser a diferentes temperaturas. As temperaturas estudadas foram 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Ao contrário do que era espectável, a relação entre a temperatura de funcionamento do laser **CPS532** e a sua FWHM não é linear, diminuindo até aos 30°C e aumentando até aos 40°C, onde atinge o seu valor máximo. À temperatura de 40°C, correspondente à temperatura máxima de funcionamento do laser, observa-se uma instabilidade no formato do pico principal e uma redução significativa da sua intensidade, atingindo um valor de 0,51. Estes resultados indicam um impacto negativo no desempenho do laser a altas temperaturas, sugerindo que operar o laser nestas condições deve ser evitado. Por outro lado, a 30°C o valor de FWHM do pico principal atinge o seu valor mínimo de 649,8 pm, com uma intensidade aceitável de 0,82. Concluiu-se assim que a temperatura que minimiza a gama espectral e que, consequentemente, aumenta a resolução espectral dos espectros Raman é 30°C.

Numa segunda fase, adquiriu-se o espectro Raman do álcool etanol com o sistema Raman desenvolvido, a 3 temperaturas diferentes. O principal objetivo desta segunda fase foi analisar a influência da temperatura de funcionamento do laser na qualidade e precisão dos espectros Raman. As temperaturas estudadas foram 25°C, 30°C e 35°C. O espectro obtido a 35°C demonstrou uma menor intensidade nos picos característicos do etanol. Quanto aos espectros obtidos a 25°C e 30°C, as suas diferenças são praticamente impercetíveis. Todos os espectros Raman do etanol obtidos com o sistema desenvolvido continham os picos característicos do composto, presentes no número de onda referenciado na literatura, indicando que o sistema foi bem calibrado e que está a operar com precisão. Futuramente, a realização desta experiência adquirindo o espectro Raman da urina a diferentes temperaturas do laser deve ser explorada, podendo levar a resultados diferentes, devido à maior complexidade da amostra.

Os parâmetros de aquisição do *software* utilizado foram otimizados adquirindo o espectro do etanol com diferentes valores destes parâmetros. Variou-se cada parâmetro, mantendo os restantes constantes. Desta análise concluímos que os parâmetros que mais impactam a qualidade dos espectros são o tempo de aquisição e o número de imagens utilizadas. Este estudo foi limitado, uma vez que não conseguimos estudar todos os valores possíveis para todos os parâmetros, porém concluímos que os valores que melhoram a qualidade do espectro final são: 31,6 segundos como tempo de exposição, 1,5 dB como ganho e 12 imagens.

Com o propósito de validar o sistema otimizado, foram adquiridos os espectros de 5 amostras de urina. Estas amostras foram fornecidas pela NOVA Medical School. Ao analisar os espectros obtidos foi possível observar que todos apresentaram picos consistentes em torno de 415  $\text{cm}^{-1}$  e a 735  $\text{cm}^{-1}$ . Na faixa dos 900  $\text{cm}^{-1}$  até cerca de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , também se observa um pico de menor intensidade com uma gama mais ampla. Com esta análise, demonstramos que o sistema Raman desenvolvido é consistente nas suas aquisições e sensível às variações de concentração dos compostos presentes numa matriz complexa, como a urina. Estes resultados reforçam a capacidade do sistema em detetar alterações na urina, fundamental para a sua utilização em análises futuras.

Por último, desenvolveu-se uma rede de aprendizagem automática com o propósito de avaliar a sua aplicabilidade na identificação de padrões em espectros Raman. Para o desenvolvimento da rede foram utilizados 619 espectros de soluções com diferentes proporções de etanol e metanol. Os parâmetros de aquisição do *software* **Spectrum Analyzer** foram variados em cada aquisição, de modo a obtermos uma

grande variedade de dados. O desenvolvimento da rede foi efetuado no programa **MATLAB**, com o auxílio dos conteúdos de suporte disponíveis no *site* do programa, de uma rede de aprendizagem previamente desenvolvida pelo orientador Alessandro Fantoni e de uma ferramenta de inteligência artificial. Os hiperparâmetros da rede controlam o seu processo de treino, executando um importante papel no desempenho final da rede. Desta forma, os hiperparâmetros *MaxEpoch*, *InitialLearningRate* e *MiniBatchSize* foram variados com o objetivo de avaliar o seu impacto no desempenho da rede. Concluiu-se que o hiperparâmetro que mais impacta a exatidão e a precisão da rede é o *InitialLearningRate*, cujo valor que otimiza o desempenho da rede é 0,001. O *MiniBatchSize* também impactou o desempenho da rede, tendo-se chegado a 16 como valor ideal para esta parâmetro. Por sua vez, o hiperparâmetro *MaxEpoch* não influenciou a rede conforme o esperado, houve apenas um maior impacto no tempo de treino da rede. Posto isto, o valor mais adequado para a rede desenvolvida é 20 *epochs*.

A rede desenvolvida demonstrou potencial para ser aplicada na classificação de espectros Raman, evidenciando a sua capacidade para identificar padrões nestes espectros com precisão. Após otimização dos hiperparâmetros, a rede atingiu uma precisão e exatidão de 100%. A rede desenvolvida é simplificada e pouco robusta, por esta razão os resultados de precisão e exatidão podem estar deturpados.

## 7. Conclusões e perspectivas futuras

As doenças renais afetam pessoas de todas as idades e contextos sociais, com variações significativas na manifestação e progressão da doença, tornando o seu diagnóstico complexo. Os procedimentos de diagnóstico e tratamento diferem, conforme a idade e género do paciente, tipo de doença renal e do prognóstico da mesma. Circunstâncias específicas, como gravidez e menopausa, bem como a localização geográfica e condições socioeconómicas, também contribuem para a complexidade e particularidades do diagnóstico e tratamento destas doenças. A dificuldade no diagnóstico é ainda acentuada pela necessidade de técnicas de imagem e análises laboratoriais e pela falta de acesso a cuidados especializados em muitas regiões. Algumas destas dificuldades podem ser ultrapassadas através de um sensor sensível e específico, capaz de identificar doenças renais fora do contexto clínico.

O principal desafio do sistema desenvolvido é o nível de ruído dos espectros obtidos e a baixa intensidade dos picos característicos das amostras, para ultrapassar esta questão é necessário a utilização de um laser com uma maior potência. Através do espectro de fluorescência da urina, constatou-se que a urina emite um nível baixo de fluorescência quando irradiada com um laser na zona do vermelho, a 635 nm. Esta observação abre novas possibilidades para o desenvolvimento de um sistema Raman com um laser de alta potência, com comprimento de onda de emissão na zona do vermelho.

A nível da montagem, alinhamento e calibração do sistema Raman, nesta fase foram bem conseguidas. Numa fase seguinte poderiam ser explorados o uso de elementos óticos mais sofisticados, de modo a amplificar a deteção da dispersão Raman.

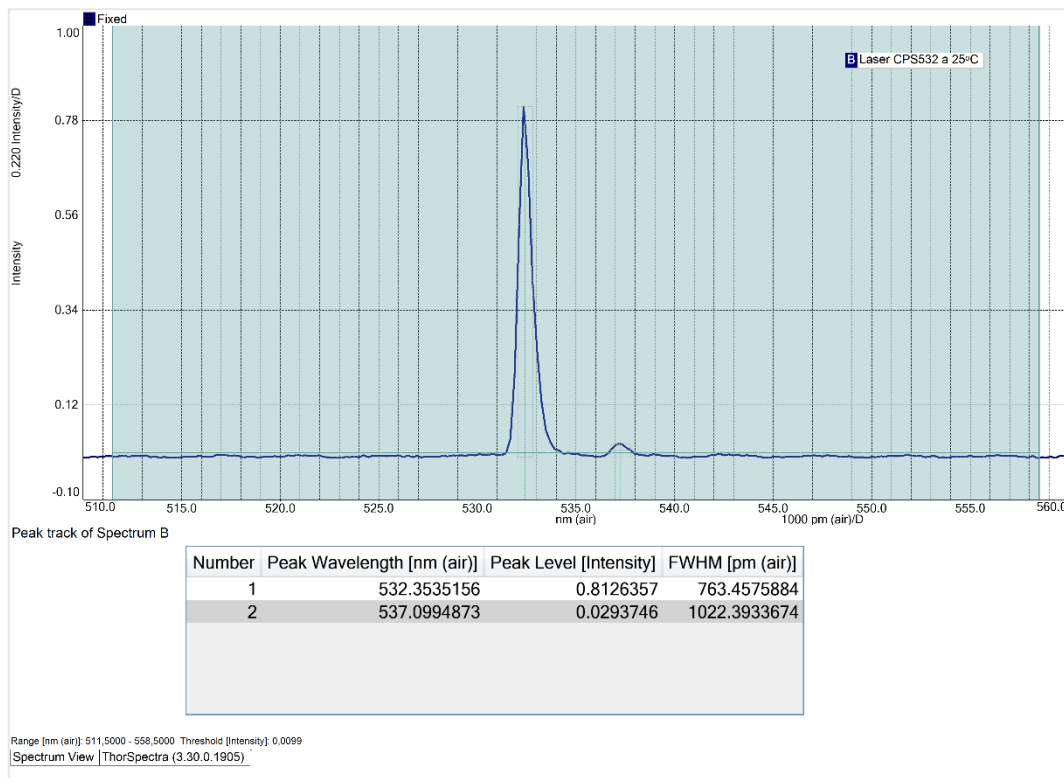
A otimização dos parâmetros de aquisição do *software* utilizado foi realizada com espectros de etanol, numa fase seguinte o impacto destes parâmetros pode ser avaliado diretamente nos espectros de urina, uma vez que o nível de complexidade é superior.

A análise dos espectros de urina com o sistema Raman desenvolvido demonstrou que o sistema é consistente nas suas aquisições e sensível às variações de concentração dos compostos presentes na amostra. Para uma análise mais detalhada, teríamos de realizar esta análise com amostras de controlo, sem qualquer doença renal e amostras de pacientes com doença renal e determinar os biomarcadores indicadores de doença renal.

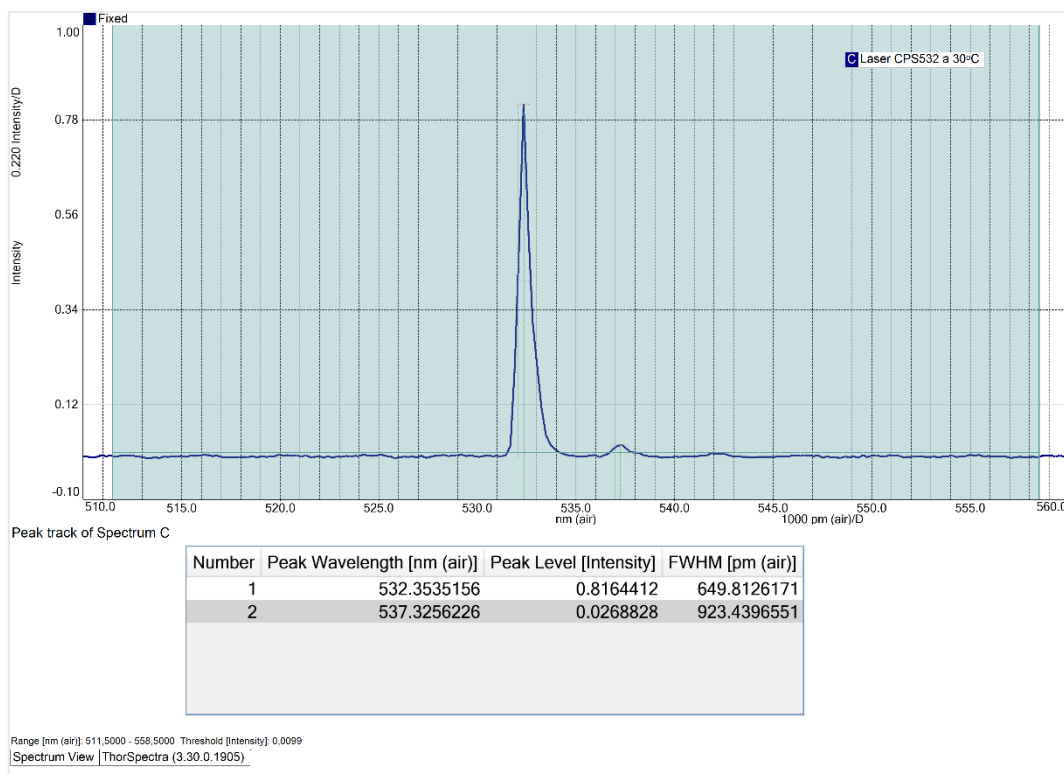
A rede de aprendizagem supervisionada desenvolvida demonstrou-se uma ferramenta eficaz na identificação de padrões nos espectros Raman e na sua classificação precisa. O treino desta rede com uma grande quantidade de espectros Raman de urina para a identificação de pacientes com doenças renais é, sem dúvida, uma oportunidade promissora a ser explorada no futuro.

De um modo geral, o processo de desenvolvimento e de otimização do sistema Raman foi bem-sucedida, considerando as limitações impostas pela instrumentação disponível e pelo orçamento restrito.

# Anexos



**Figura 46.** Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 25°C.



**Figura 47.** Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 30°C.

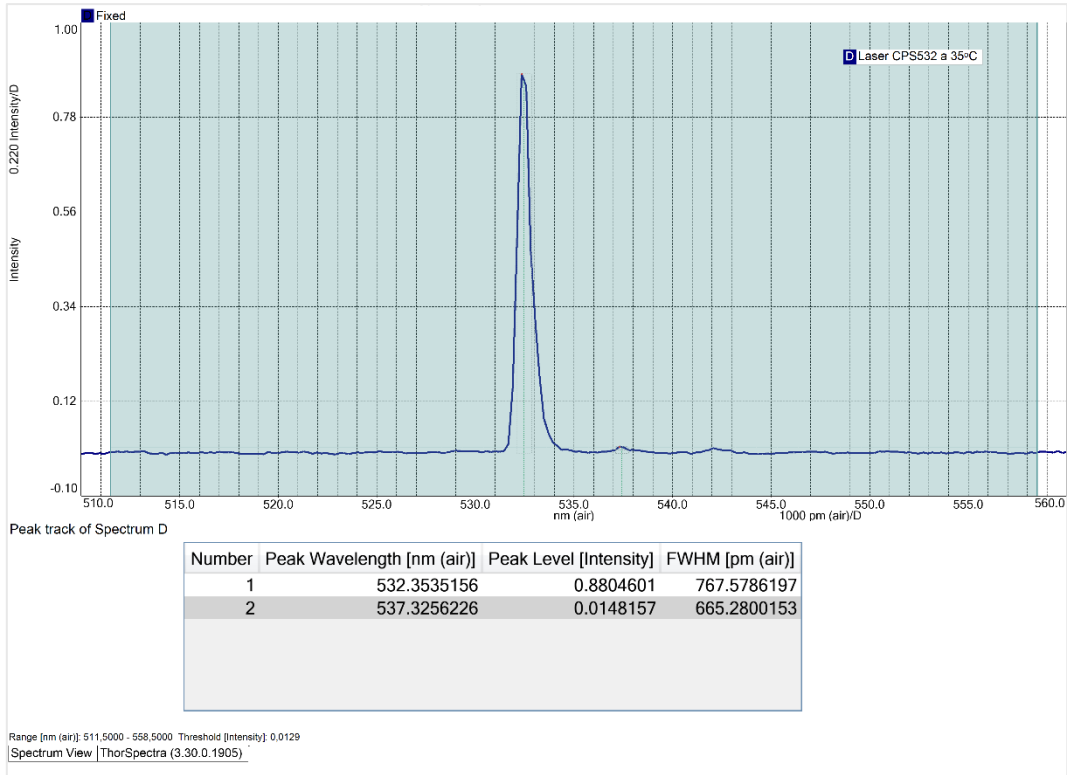


Figura 48. Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 35°C.

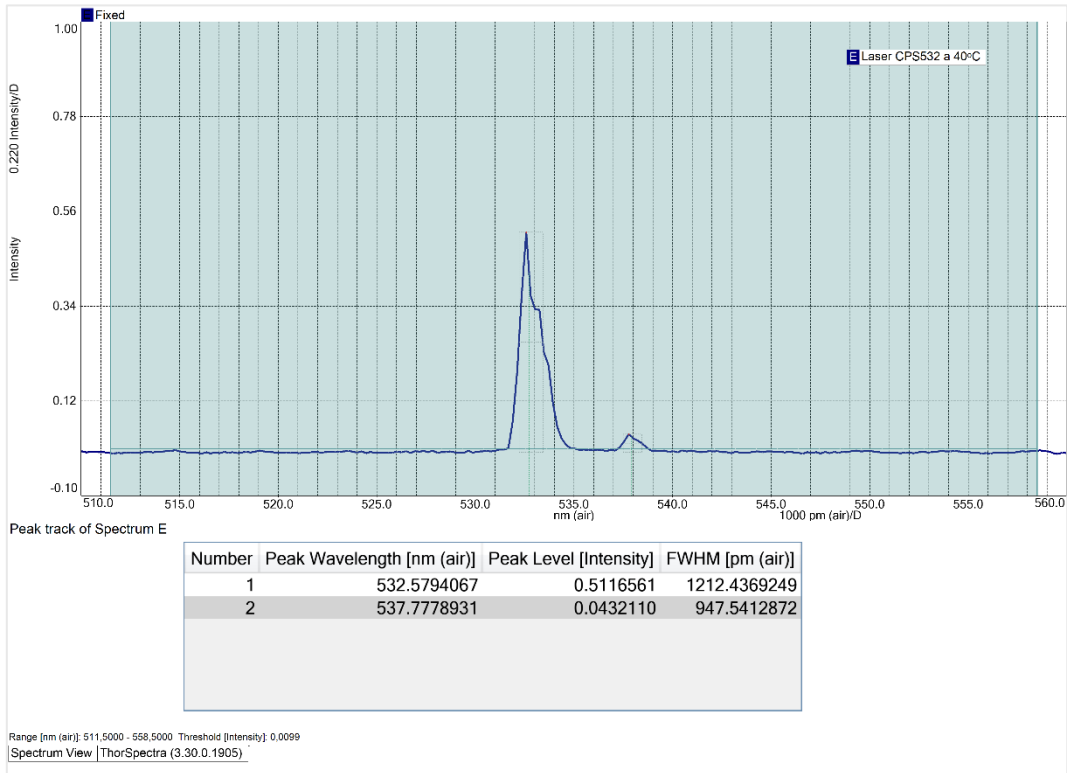


Figura 49. Espectro do laser CPS532 com temperatura de funcionamento de 40°C.

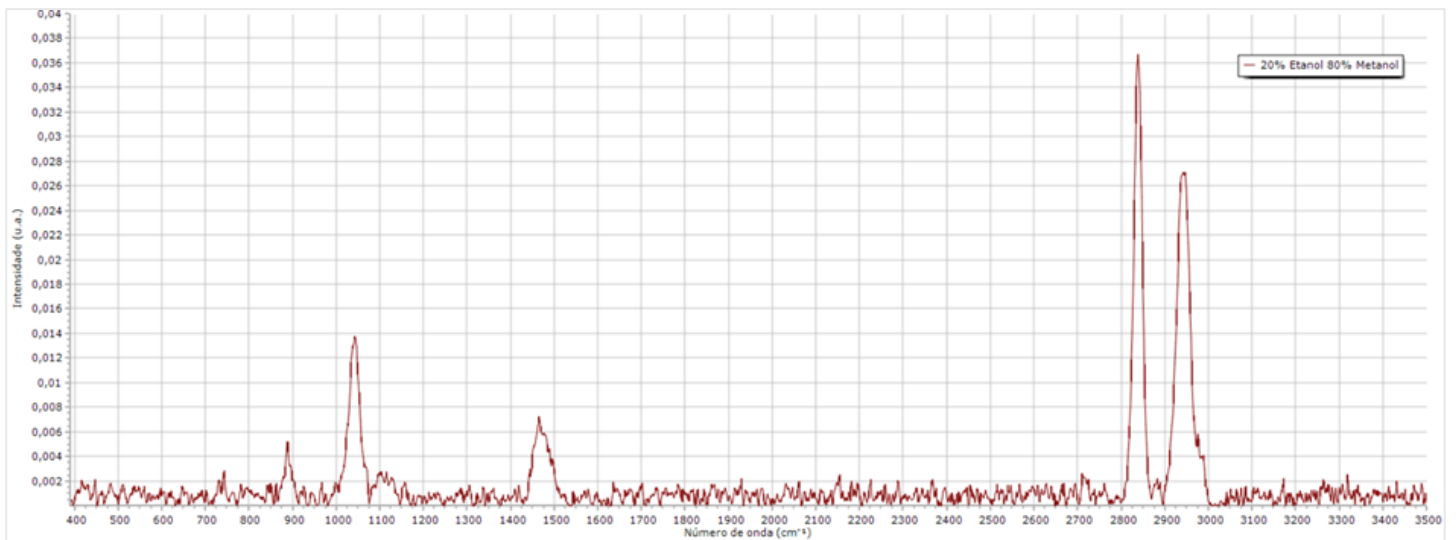


Figura 50. Espectro Raman da solução 20% Etanol e 80% Metanol.

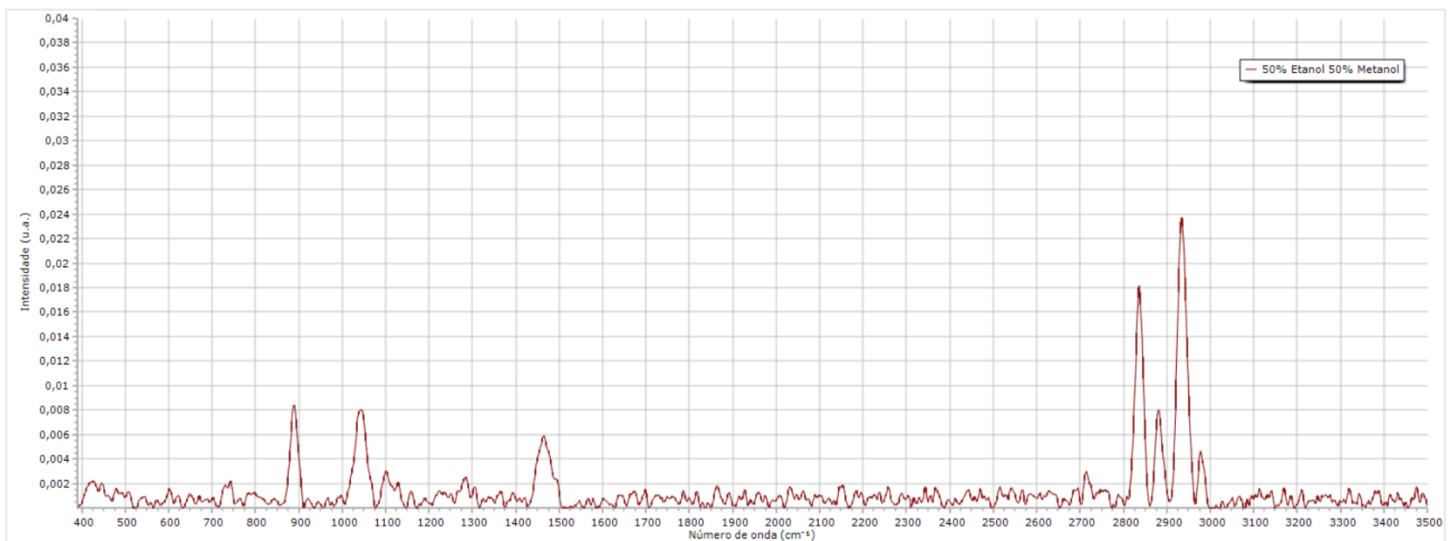


Figura 51. Espectro Raman da solução 50% Etanol e 50% Metanol.

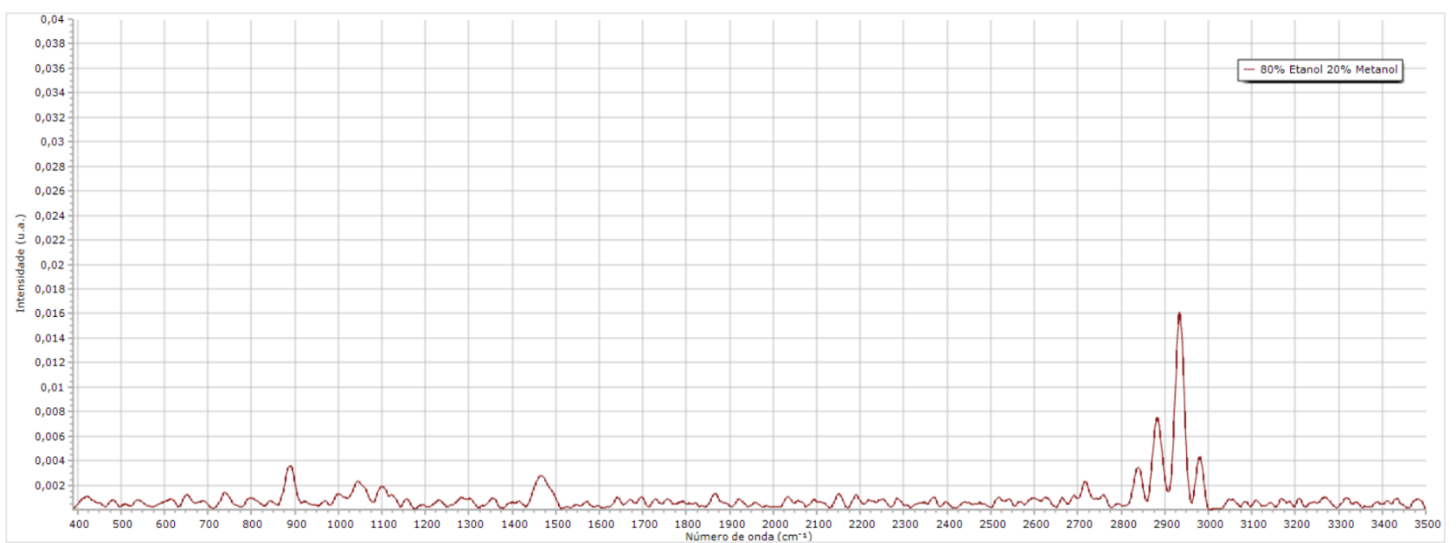
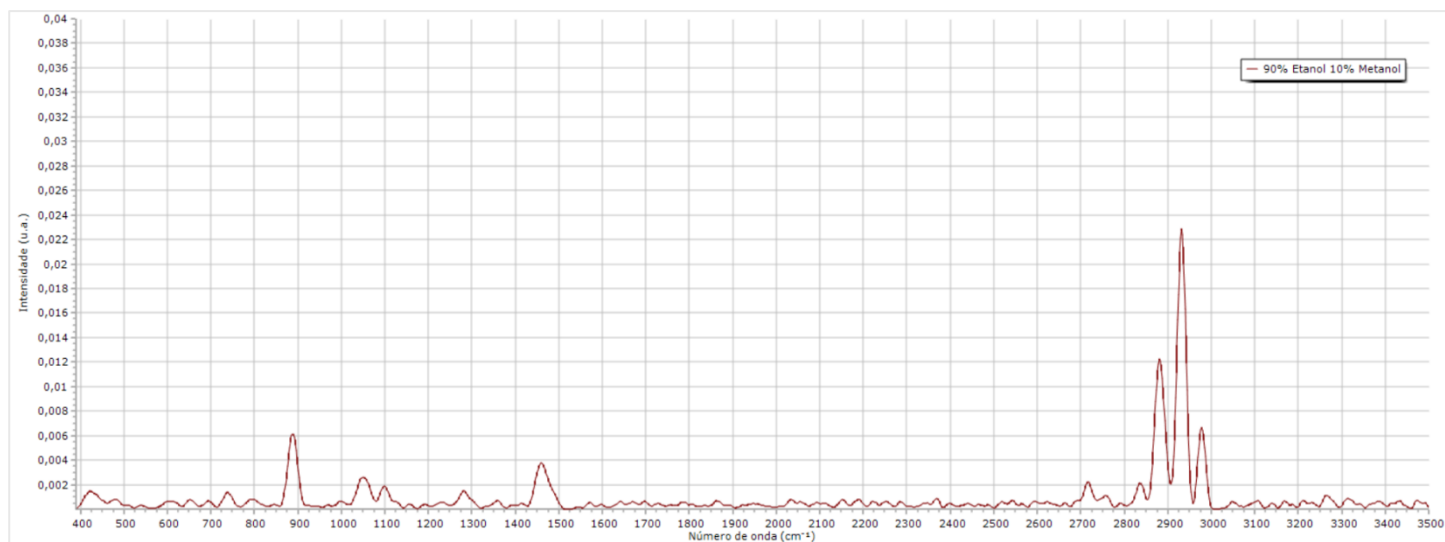


Figura 52. Espectro Raman da solução 80% Etanol e 20% Metanol.



**Figura 53.** Espectro Raman da solução 90% Etanol e 10% Metanol.

## Referências bibliográficas

- [1] APIR - Associação Portuguesa de Insuficientes Renais, «A Doença Renal Crónica e os seus Tratamentos», 2018.
- [2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD Work Group, «KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease», *Kidney Int.*, vol. 105, n. 4S, pp. S117–S314, Abr. 2024, doi: 10.1016/s0085-2538(24)00110-8.
- [3] J. A. Kellum, P. Romagnani, G. Ashuntantang, C. Ronco, A. Zarbock, e H. J. Anders, «Acute kidney injury», *Nat Rev Dis Primers*, vol. 7, n. 1, Dez. 2021, doi: 10.1038/s41572-021-00284-z.
- [4] S. G. Coca e C. R. Parikh, «Urinary biomarkers for acute kidney injury: Perspectives on translation», *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 3, n. 2, pp. 481–490, Mar. 2008, doi: 10.2215/CJN.03520807.
- [5] F. Turgut, A. S. Awad, e E. M. Abdel-Rahman, «Acute Kidney Injury: Medical Causes and Pathogenesis», *J Clin Med*, vol. 12, n. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/jcm12010375.
- [6] C. Chen *et al.*, «Urine Raman spectroscopy for rapid and inexpensive diagnosis of chronic renal failure (CRF) using multiple classification algorithms», *Optik (Stuttg)*, vol. 203, Fev. 2020, doi: 10.1016/j.ijleo.2019.164043.
- [7] N. Kuhar, S. Sil, T. Verma, e S. Umapathy, «Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials», *RSC Adv*, vol. 8, n. 46, pp. 25888–25908, 2018, doi: 10.1039/c8ra04491k.
- [8] M. J. Jeng *et al.*, «Raman Spectral Characterization of Urine for Rapid Diagnosis of Acute Kidney Injury», *J Clin Med*, vol. 11, n. 16, Ago. 2022, doi: 10.3390/jcm11164829.
- [9] E. Smith e G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, 2.<sup>a</sup> ed. Wiley, 2019.
- [10] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, e C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, 2003.
- [11] P. J. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, 2011.
- [12] E. Smith e G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach*. 2005.
- [13] F. A. Miller e G. B. Kauffman, «C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect», *J Chem Educ*, vol. 66, pp. 795–801, 1989.
- [14] C. V. Raman e K. S. Krishnan, «A New Type of Secondary Radiation», *Nature*, vol. 121, n. 3048, pp. 501–502, 1928, doi: 10.1038/121501c0.
- [15] C. V. Raman, «Nobel Lecture - The Molecular Scattering of Light». Acedido: 28 de Dezembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1930/raman/lecture/>
- [16] G. G. Hoffmann, *Infrared and Raman spectroscopy : Principles and Applications*. 2023.
- [17] C. Delrue e M. M. Speeckaert, «The Potential Applications of Raman Spectroscopy in Kidney Diseases», *J Pers Med*, vol. 12, n. 10, Out. 2022, doi: 10.3390/jpm12101644.
- [18] Paschotta e Rüdiger, *Field Guide to Lasers*, vol. FG12. SPIE, 2007.
- [19] P. Ponce *et al.*, *Manual de Nefrologia*. Lidel, 2020.
- [20] J. L. B. de Aquino, K. Boteselle, e R. Nobre, *Guia Prático de Nefrologia*. São Paulo: Pimenta Cultural, 2021.
- [21] A. J. P. Lewington, J. Cerdá, e R. L. Mehta, «Raising awareness of acute kidney injury: A global perspective of a silent killer», 2013, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/ki.2013.153.
- [22] L. S. Chawla, P. W. Eggers, R. A. Star, e P. L. Kimmel, «Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes», *New England Journal of Medicine*, vol. 371, n. 1, pp. 58–66, Jul. 2014, doi: 10.1056/nejmra1214243.

- [23] Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD Work Group., «KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury», *Kidney Int Suppl* (2011), vol. 2, n. 1, pp. 1–138, 2012, doi: 10.1038/kisup.2012.1.
- [24] P. Drawz e M. Rahman, «Chronic Kidney Disease», *Ann Intern Med*, 2015.
- [25] W. Ranjith Premasiri, R. H. Clarke, e M. E. Womble, «Urine Analysis by Laser Raman Spectroscopy», *Lasers Surg Med*, vol. 28, pp. 330–334, 2001.
- [26] W. J. McMurdy e A. J. Berger, «Raman Spectroscopy-Based Creatinine Measurement in Urine Samples from a Multipatient Population», *Appl Spectrosc*, vol. 57, n. 5, pp. 522–525, 2003.
- [27] J. A. M. Bispo, E. E. de Sousa Vieira, L. Silveira, e A. B. Fernandes, «Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis», *J Biomed Opt*, vol. 18, n. 8, p. 087004, Ago. 2013, doi: 10.1117/1.jbo.18.8.087004.
- [28] J. Chi *et al.*, «Use of surface-enhanced Raman scattering as a prognostic indicator of acute kidney transplant rejection», *Biomed Opt Express*, vol. 6, n. 3, p. 761, Mar. 2015, doi: 10.1364/boe.6.000761.
- [29] C. Ronco, R. Bellomo, e J. A. Kellum, «Emerging Biomarkers of Acute Kidney Injury», *Contrib Nephrol*, vol. 156, pp. 203–212, 2007.
- [30] J. A. Kellum, P. Romagnani, G. Ashuntantang, C. Ronco, A. Zarbock, e H. J. Anders, «Acute kidney injury», 1 de Dezembro de 2021, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41572-021-00284-z.
- [31] P. Devarajan, «Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury», *Nephrology*, vol. 15, n. 4, pp. 419–428, Jun. 2010, doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x.
- [32] S. Supavekin, W. Zhang, R. Kucherlapati, F. J. Kaskel, L. C. Moore, e P. Devarajan, «Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion», *Kidney Int*, vol. 63, pp. 1714–1724, 2003.
- [33] J. Mishra *et al.*, «Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury», *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 14, n. 10, pp. 2534–2543, Out. 2003, doi: 10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6.
- [34] K. Mori *et al.*, «Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, n. 3, pp. 610–621, Mar. 2005, doi: 10.1172/jci200523056.
- [35] Melnikov Y. M. *et al.*, «Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure», *J. Clin. Invest.*, vol. 107, pp. 1145–1152, 2001.
- [36] C. R. Parikh, E. Abraham, M. Ancukiewicz, e C. L. Edelstein, «Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit», *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, n. 10, pp. 3046–3052, 2005, doi: 10.1681/ASN.2005030236.
- [37] C. R. Parikh, A. Jani, V. Y. Melnikov, S. Faubel, e C. L. Edelstein, «Urinary Interleukin-18 Is a Marker of Human Acute Tubular Necrosis», *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 43, n. 3, pp. 405–414, 2004, doi: 10.1053/j.ajkd.2003.10.040.
- [38] M. Haase, R. Bellomo, D. Story, P. Davenport, e A. Haase-Fielitz, «Urinary interleukin-18 does not predict acute kidney injury after adult cardiac surgery: A prospective observational cohort study», *Crit Care*, vol. 12, n. 4, Ago. 2008, doi: 10.1186/cc6972.
- [39] S. S. Soni, C. Ronco, N. Katz, e D. N. Cruz, «Early diagnosis of acute kidney injury: The promise of novel biomarkers», *Blood Purif*, vol. 28, n. 3, pp. 165–174, Out. 2009, doi: 10.1159/000227785.

- [40] J. L. Koyner *et al.*, «Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery», *Kidney Int*, vol. 74, n. 8, pp. 1059–1069, Out. 2008, doi: 10.1038/ki.2008.341.
- [41] L. D. Jones, D. Golan, S. A. Hanna, e M. Ramachandran, «Artificial intelligence, machine learning and the evolution of healthcare», *Bone Joint Res*, vol. 7, n. 3, pp. 223–225, Mar. 2018.
- [42] R. Y. Choi, A. S. Coyner, J. Kalpathy-Cramer, M. F. Chiang, e J. Peter Campbell, «Introduction to machine learning, neural networks, and deep learning», *Transl Vis Sci Technol*, vol. 9, n. 2, 2020, doi: 10.1167/tvst.9.2.14.
- [43] M. Nielsen, *Neural Networks and Deep Learning*. Determination Press, 2016.
- [44] C. C. Aggarwal, *Neural Networks and Deep Learning*. Springer, 2018.
- [45] A. Fantoni *et al.*, «The LUMINA setup for a light-based urine monitoring and analysis», em *SPIE*, SPIE-Intl Soc Optical Eng, Jun. 2024, p. 26. doi: 10.1117/12.3022182.
- [46] OpenRAMAN, «OpenRAMAN Spectrum Analyzer V1.0.0 Manual». Acedido: 24 de Julho de 2024. [Em linha]. Disponível em: <https://www.thepulsar.be/files/manual.pdf>
- [47] D. Wieboldt, «Understanding Raman Spectrometer Parameters», *Spectroscopy Supplements*, Jun. 2010.
- [48] T. Acharya e K. A. Ray, *Image Processing: Principles and Applications*, 1.<sup>a</sup> ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005.
- [49] «Starter Edition Assembly – OpenRAMAN». Acedido: 1 de Julho de 2024. [Em linha]. Disponível em: <https://www.open-raman.org/build/starter-edition/assembly/>
- [50] FLIR, «Getting Started FLIR BLACKFLY® GigE Vision», 2017. [Em linha]. Disponível em: <https://www.flir.eu/support/products/blackfly-gige/#Documents>
- [51] S. Burikov, T. Dolenko, S. Patsaeva, Y. Starokurov, e V. Yuzhakov, «Raman and IR spectroscopy research on hydrogen bonding in water-ethanol systems», *Mol Phys*, vol. 108, n. 18, pp. 2427–2436, Set. 2010, doi: 10.1080/00268976.2010.516277.