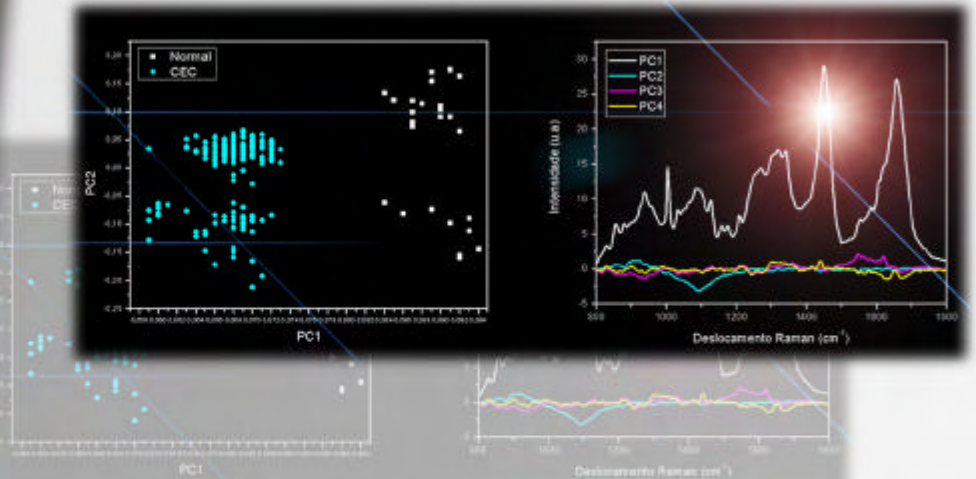




Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Câmpus de Araçatuba



# Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do carcinoma espinocelular de mucosa bucal. Estudo "ex vivo" em humanos

*Cristiane Fumiko Furuse*



Araçatuba  
2006

**Cristiane Fumiko Furuse**

*Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do  
carcinoma espinocelular de mucosa bucal. Estudo  
“ex vivo” em humanos.*

**Araçatuba - SP  
2006**

**Cristiane Fumiko Furuse**

*Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do  
carcinoma espinocelular de mucosa bucal. Estudo  
“ex vivo” em humanos.*

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do  
Campus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do  
Grau de “Doutor em Odontologia” - Área de  
Concentração Estomatologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Eder Ricardo Biazolla  
Co-orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin**

**Araçatuba - SP  
2006**

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F992e

Furuse, Cristiane Fumiko

Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do carcinoma espino-celular de mucosa bucal : estudo “ex vivo” em humanos / Cristiane Fumiko Furuse. - Araçatuba : [s.n.], 2006

87 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006

Orientador: Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli

Co-orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin

1. Análise espectral Raman 2. Carcinoma de células escamosas  
3. Diagnóstico 4. Neoplasias bucais

Black D6  
CDD 617.632

## **DADOS CURRICULARES**

### **CRISTIANE FUMIKO FURUSE**

- NASCIMENTO - 14.06.77 – Rolândia – PR
- FILIAÇÃO - Edson Yoshinori Furuse e Aparecida Venâncio Furuse
- 1996 – 1999 - Curso de Graduação: Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp.
- 2000 – 2001 - Curso de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde na Área de Estomatologia, do Hospital Heliópolis.
- 2000 – 2001 - Curso de Especialização em Estomatologia.
- 2001 – 2003 - Curso de Pós-graduação em Estomatologia, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp.
- 2004 – 2006 - Curso de Pós-graduação em Estomatologia, nível de Doutorado, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp.

*Dedicat6ria*

*À Deus,*

*que torna possível todas as coisas.*

*“O coração do homem traça o seu caminho,*

*mas o Senhor lhe dirige os passos”*

*(Pv. 16:9)*

*Aos meus pais, responsáveis pela minha formação moral e  
profissional; Meus irmãos Adilson, Flávia e Mariana  
pelo apoio, incentivo e confiança em mim depositados.  
Minhas queridas sobrinhas Fernanda e Rebeca que me  
fazem muitíssimo feliz.*



# *Agradecimentos Especiais*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Neste longo caminho, vários são os agradecimentos acumulados. Espero contemplar a todos e, se porventura, esquecer de alguém, com certeza se deve a um lapso temporário de memória.

Ao orientador Prof. Dr. Eder Ricardo Biazolla que confiou e acreditou em mim desde o início até os momentos mais difíceis do doutorado; pelas críticas, incentivos, ensinamentos, e principalmente, pela segurança na orientação. Agradeço os ensinamentos transmitidos, que me proporcionaram enriquecimento profissional, intelectual e pessoal, bem como a amizade cultivada.

Ao co-orientador Prof. Dr. Airton Abrahão Martin pela dedicação, estímulo e compromisso constante com o ensino e a pesquisa, pelas curtas, mas proveitosas discussões norteando e valorizando cada etapa desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Veronese minha admiração e um especial agradecimento ao incentivo constante e pela atenção, presteza e disposição a mim sempre dispensadas.

À Dra. Renata Andrade Bitar pela preciosa ajuda e disposição sempre presentes, além de muita paciência, dispondo-se mais do que uma profissional, evidenciando além de competência, abnegação e amizade. Sem as suas qualidades, este trabalho não teria sido

concluído... Obrigada também aos seus familiares pelo cuidado estendido a mim.

De modo especial, à Dra. Suzy Elaine Nobre de Freitas e Anyele Cervantes: minha história de vida está marcada por essas amizades queridas. "Amigo é pra se guardar..."

Aos colegas de Doutorado, Rafael Akira Murayama e Daniel Galera Bernabé sempre dispostos a colaborar com seus conhecimentos, convivemos agradavelmente e hoje considero mais que simples colegas, Amigos!

À Juliana Benevenuto Reis, Jane Fátima Mendes e Shirleni Cantieri Cavazana e Nair Ramos Macedo (Naná) funcionárias do Centro de Oncologia Bucal pela paciência, carinho e amizade;

Aos Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho, da Universidade do Vale do Paraíba, de São José dos Campos – SP, pelo acompanhamento e apoio;

Ao Marco Mória, por estar fazendo parte deste momento especial da minha vida;

À cada paciente que, por compartilhar sua história, sofrimento e esperança motivou-me a continuar na busca do conhecimento sem perder em momento algum a benevolência e o amor à vida.

# *Agradecimientos*

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –UNESP, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Centro de Oncologia Bucal, Unidade Auxiliar da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –UNESP, representado pelo Supervisor Prof. Dr. Norberto Perri Moraes.

À Universidade do Vale do Paraíba, de São José dos Campos – SP, pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos.

Ao Instituto de Patologia de Araçatuba, representado pelo Dr. Neivio José Mattar e Dr. Luiz Alberto Veronese.

À todos da Seção de Pós-Graduação pela prontidão com que sempre que atenderam;

Aos funcionários da Biblioteca pelo atendimento e consideração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que proveu os recursos financeiros para que esta pesquisa se realizasse (Processo nº 140908/2004-8).

A todos que estiveram ao meu lado e que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!

---

*Cristiane Fumiko Furuse*

*Epígrafe*

”É melhor tentar e falhar, que preocupar-se a ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

**Martin Luther King**

*Resumo*



Furuse, CF. Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do carcinoma espinocelular de mucosa bucal. Estudo “ex vivo” em humanos. [Tese] Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2006.

O câncer é uma das doenças mais sérias que têm ameaçado a saúde e a vida e sua influência tem aumentado. Dentre os cânceres, o de boca constitui-se um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo, inclusive em países desenvolvidos, estando entre os 10 tipos mais comuns. A espectroscopia FT-Raman é uma ferramenta analítica moderna cujo uso no diagnóstico do câncer poderá apresentar inúmeras vantagens para os pacientes, resultados mais rápidos com o mínimo de invasibilidade. Neste estudo, foram analisados espectros FT-Raman de 81 amostras de tecido neoplásico e 48 de mucosa bucal normal, de 26 e 18 pacientes, respectivamente. Um laser Nd:YAG à 1064nm foi utilizado como fonte de excitação no FT-Raman, RFS 100/S Espectrômetro, Bruker®, Alemão. As biópsias foram divididas em dois fragmentos, um seguiu a rotina de procedimentos para diagnóstico. O outro foi imediatamente armazenado em tubo criogênico de 1,2 ml Nalgene® e congelado em galão de nitrogênio líquido, numa temperatura de 196°C negativos, para preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais. Os espectros FT-Raman obtidos foram analisados através da

Análise dos Componentes Principais (PCA). A análise foi executada comparando o tecido normal com o CEC. A PCA foi usada para verificar as diferenças estatísticas na amostra. A técnica de PCA provou ser eficiente para análise, mostrando que a Espectroscopia FT-Raman apresentou resultados significativos.

**Palavras-chave:** Análise Espectral Raman, Carcinoma de Células Escamosas, Diagnóstico, Câncer Oral.

*Abstract*

Furuse, CF. FT-Raman Spectroscopy Study of Human *ex vivo* Squamous Cell Carcinoma. [Tesis] Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2006.

Cancer is one of the most serious diseases threatening human health and life, and the influence of this disease becomes increasing. Among the cancers, oral cancer is constituted in a serious health problem in several areas of the world even in developed countries. Globally oral cancer is one among the 10 most common cancers. FT-Raman spectroscopy is a modern analytical tool and it is believed that its use for cancer diagnosis will lead to several advantages for patients, faster results and a minimization of invasivity. In this study, were analyzed FT-Raman spectra of 81 sample of malignant human oral lesions, Squamous Cell Carcinoma (SCC) and 48 of non-diseased, of 26 and 18 patient, respectively. A Nd: YAG laser at 1064nm was used as the excitation source in the FT-Raman, RFS 100/S Spectrometer, Bruker®, Germany. The biopsies were divided in two fragments, one followed the routine of procedures for diagnosis. The other was stored immediately in cryogenic tube of 1,2 ml Nalgene® and frozen in gallon of liquid nitrogen, in a temperature of 196°C negative, for preservation and maintenance of all the tissues structures. Principal Components Analysis (PCA) was applied to FT-Raman spectra of non-

diseased and SCC. PCA was used to verify the statistical differences in the sample. The technique of PCA proved to be efficient for analysis, showing that FT-Raman Spectroscopy showed significant results.

**Keywords:** Lasers, Spectroscopy, Oral Cancer, Squamous Cell Carcinoma, Principal Components Analysis.

*Listas*

**LISTA DE FIGURA**

		Página
Figura 1 -	FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker®	35

## LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1 -	Espectro típico de mucosa normal e carcinoma espinocelular de boca no intervalo entre 800 e 1800 $\text{cm}^{-1}$	41
Gráfico 2 -	Principal Componente 1, Principal Componente 2, Principal Componente 3 e Principal Componente 4 obtidos dos espectro Raman.	42
Gráfico 3 -	Escores do Principal Componente 1 versus 2 (PC1 X PC2) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo. A linha empírica de diagnóstico, nesta figura, separa o tecido normal do CEC.	43
Gráfico 4 -	Escores do Principal Componente 1 versus 3 (PC1 X PC3) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo. A linha empírica de diagnóstico, nesta figura, separa o tecido normal do CEC.	44
Gráfico 5 -	Escores do Principal Componente 2 versus 3 (PC2 X PC3) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo.	45



Gráfico 6 -	Principal Componente 1, obtido do espectro Raman.	86
Gráfico 7 -	Principal Componente 2, obtido do espectro Raman.	86
Gráfico 8 -	Principal Componente 3, obtido do espectro Raman.	87
Gráfico 9 -	Principal Componente 4, obtido do espectro Raman.	87

### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CEC	- carcinoma espinocelular
PCA	- Análise dos Componentes Principais
PC	- Principal Componente
S	- pesos representativos de cada PC
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
COB	- Centro de Oncologia Bucal
nm	- Nanômetro = $1 \times 10^{-9}$ metro
FT	- Transformada de Fourier
IR	- Infravermelho
LEVB	- Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
mW	- MiliWatts
Nd	- Neodímio
YAG	- Ytrium – Aluminium – Garnet
NIR	- Infravermelho próximo

# *Sumário*

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 CASUÍSTICA E MÉTODO.....	33
2.1 Realização da Espectroscopia de FT-Raman.....	35
2.2 Análise dos Dados.....	37
3 RESULTADO.....	39
4 DISCUSSÃO.....	44
5 CONCLUSÃO.....	51
6 REFERÊNCIAS.....	53
7 ANEXOS.....	62

# *Introdução*

## **1 INTRODUÇÃO\***

O câncer é uma das doenças mais sérias que têm ameaçado a saúde e a vida da população, sua incidência tem aumentado nos últimos anos. É impossível controlar o progresso do câncer de pacientes em fases terminais.<sup>1</sup> Dessa forma, o diagnóstico precoce e a terapia adequada e imediata tem sido as mais efetivas técnicas para que se consiga aumentar a taxa de sobrevida do paciente.<sup>1,2</sup>

Dentre os cânceres, o de boca constitui-se em um grave problema de saúde pública.<sup>3-6</sup> Em países em desenvolvimento o câncer de boca é o terceiro mais freqüente, após o câncer de cérvix e estômago.<sup>7</sup>

A sobrevida global aos 5 anos gira em torno de 55%, sendo que 20% da mortalidade é associada à própria evolução do tumor e 20% a segundos tumores primários.<sup>3,5,8</sup> A baixa taxa de sobrevida, apesar dos avanços nas modalidades terapêuticas está associada à detecção tardia<sup>3,9</sup> e demora no diagnóstico.<sup>6,10,11</sup>

O método padrão utilizado para se obter o diagnóstico de uma lesão tem sido a biópsia e análise histopatológica.<sup>11</sup> Este método se baseia na análise subjetiva dos cortes obtidos da peça operatória e

depende da experiência individual do patologista, <sup>12-15</sup> podendo levar a repetições de biópsias, <sup>16</sup> o que pode atrasar o diagnóstico e aumentar o custo. <sup>10,17</sup>

Através do exame histopatológico, pode-se avaliar o grau de diferenciação celular, número de mitoses, características citológicas, morfológicas e estruturais. Entretanto, a biópsia convencional apresenta algumas desvantagens como, a necessidade de remoção do tecido a ser analisado, a não obtenção do resultado imediato, o armazenamento inadequado pode induzir alterações bioquímicas no tecido biopsiado, e finalmente, o diagnóstico histopatológico baseia-se nas anormalidades morfológicas <sup>12,17,18</sup> e não nas mudanças das estruturas na bioquímica do tecido. <sup>11</sup> Dessa forma, tem-se buscado o desenvolvimento de uma técnica diagnóstica rápida e precisa. <sup>11,17</sup>

Nesse sentido, uma das técnicas que apresenta potencial para contribuir para o diagnóstico do câncer é a espectroscopia ótica (ANEXO III), que tem demonstrado ser uma alternativa na detecção de alterações neoplásicas. <sup>1-3,5,10,12,13,17,19-35</sup>

Esta técnica é rápida, objetiva, não invasiva e pode ser desenvolvida para análise *in situ* da lesão, evitando a necessidade da remoção de fragmentos de tecido e preparação das amostras para análise histológica. <sup>12,14,15,17,20,28,31</sup> Uma das principais vantagens desta

técnica é que ela fornece informações sobre as alterações bioquímicas, estruturais e fisiopatológicas dos tecidos.<sup>11-13,17</sup>

A Espectroscopia Raman é uma técnica óptica que fornece informações sobre os graus de vibração molecular das amostras sendo utilizada em estudos analíticos quantitativos e qualitativos nas áreas de química, geologia, farmacologia, e físicas de estado sólido.<sup>36</sup> Recentemente, emergiu como uma ferramenta analítica não-destrutiva para caracterização bioquímica de sistemas biológicos, por possuir inúmeras vantagens como sensibilidade a pequenas mudanças estruturais, não ser invasiva e apresentar alta resolução espacial de campo, no caso da microscopia Raman.

Esta técnica quando emprega a Transformada de Fourier (FT) que utiliza fontes luminosas na região próximo ao infravermelho que, devido à supressão da fluorescência, consegue identificar sinais Raman fracos (ANEXO III).<sup>36</sup>

Dessa forma, foi objetivo deste estudo analisar espectros de tecido normal e de carcinoma espinocelular de boca através da Análise dos Componentes Principais (PCA), verificando a possibilidade da espectroscopia FT-Raman se tornar um exame diagnóstico para o carcinoma espinocelular de boca.



# *Casuística e Método*

## **2 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO I). Todos os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Esclarecido.

Foram colhidas 81 amostras de tecido neoplásico e 48 de tecido normal, de 26 e 18 pacientes, respectivamente, matriculados no Centro de Oncologia Bucal (COB), Unidade Auxiliar da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp, no período entre setembro de 2004 e setembro de 2006, cada amostra proporcionou 3 espectros Raman.

As biópsias foram divididas em duas partes, uma seguiu a rotina de procedimentos para diagnóstico. A outra, foi imediatamente armazenada em tubo criogênico de 1,2 ml Nalgene® devidamente identificado e numerado, sendo mantida a identidade do paciente em sigilo. Estas amostras foram congeladas em galão de nitrogênio líquido, numa temperatura de 196°C negativos, para preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais. Depois foram levadas ao Laboratório de

Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP – São José dos Campos/SP.

### 2.1 Realização da Espectroscopia de FT-Raman

A espectroscopia foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP – São José dos Campos, utilizando aparelho FT-Raman (FT-Raman Spectrometer RFS 100 da Bruker® Alemão) com laser Nd:YAG emitindo um comprimento de onda em 1064 nm (Figura 1).



Figura 1 - FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker®

Os fragmentos foram descongelados individualmente em solução de soro fisiológico a 0,9%, para que o tecido alcançasse rapidamente a temperatura ambiente e mantendo-o úmido evitando a degradação e desidratação. Na seqüência, foram colocados em um porta-amostra de alumínio.

O porta-amostra foi fixado em um suporte específico dentro do compartimento de amostras no equipamento FT-Raman, sendo posteriormente fechado. O espectro de Raman foi obtido fazendo-se a luz monocromática do laser Nd:YAG incidir sobre 3 pontos distintos de cada amostra, numa potência de 155mW e 300 *scans* em cada ponto da amostra. O tempo total não ultrapassou 10 minutos.

Após a incidência do laser, a luz espalhada foi captada por uma fibra óptica composta de um interferômetro de Michelson e um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido. A luz espalhada chega ao detector que converte a intensidade da luz em sinais elétricos, que por sua vez, são interpretados em um computador na forma de espectro Raman. No computador foi realizada a conversão dos dados obtidos pela expressão matemática da Transformada de Fourier, produzindo um espectro com seus picos característicos para as amostras em estudo.

Após a coleta dos espectros, os fragmentos dos tecidos analisados foram armazenados em frascos contendo formol a 10%,

encaminhados para exame histológico para confirmação do resultado obtido através da espectroscopia.

## 2.2 Análise dos Dados

Para análise foram selecionados os espectros Raman obtidos apenas daqueles fragmentos identificados histologicamente como sendo mucosa e estroma, para comporem o grupo "Normal", e CEC para o grupo "CEC".

Foi realizada a discriminação quantitativa entre os grupos analisados utilizando a PCA, aplicada para reduzir dimensionalmente as variáveis de um grupo de dados através de uma análise de covariância entre os diferentes fatores. Desta maneira, a PCA se torna útil possibilitando organizar grande quantidade de informações em pequenos grupos de componentes semelhantes.<sup>37</sup> Os espectros foram submetidos a PCA através do software MINITAB® Release 14.20 ou OPUS®.

A PCA extrai as informações relevantes dos dados originais e gera um novo conjunto de variáveis, chamado de Componentes Principais (PC) e *score* (S).

O S representa a importância de cada PC na formação do espectro original, isto pode ser usado para construir um algoritmo

baseado na PCA para relacionar os achados histológicos ao espectro Raman.

O PC está relacionado à variação mais importante que ocorre em todos os espectros; o primeiro PC representa a maioria das variações dos dados, os últimos representam apenas ruídos.

*Resultado*

### **3 RESULTADO**

O gráfico 1 mostra um espectro típico de mucosa normal e carcinoma espinocelular de boca no intervalo entre 800 e 1800 $\text{cm}^{-1}$ . Esta figura foi obtida diretamente após exposição ao laser, mostrando ausência de fluorescência de fundo e a eficiência da energia a 1064nm na supressão da excitação eletrônica.

Os dados foram normalizados no pico de 1450  $\text{cm}^{-1}$ . Foram observadas diferenças na intensidade vibracional das bandas tanto no tecido normal quanto no tumoral, podendo ser usada para diferenciá-los.



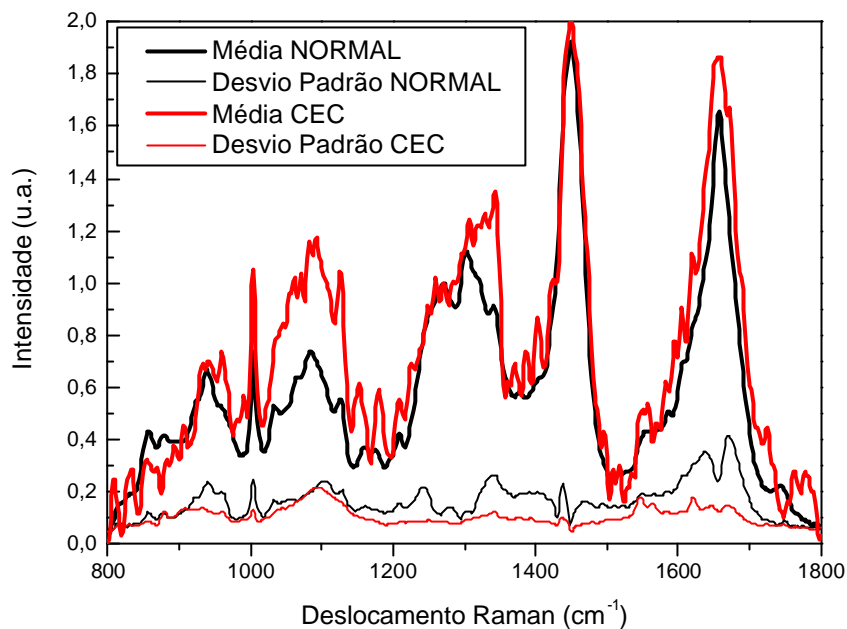


Gráfico 1 - Espectro típico de mucosa normal e carcinoma espinocelular de boca no intervalo entre 800 e 1800  $\text{cm}^{-1}$

O gráfico 2 ilustra os quatro primeiros PCs que se assemelham ao espectro Raman, porém com bandas positivas e negativas.

Uma vez que o PC2 apresenta bandas de intensidade positiva e todas as principais bandas estão nas mesmas posições, assim como, no espectro de tecido normal, demonstra informação qualitativa relativa ao tipo de tecido. O PC4 tem as mesmas posições de banda, mas algumas bandas são negativas, indicando diferenças de intensidade.

Posteriormente, foram relacionados os componentes principais PC1 e PC2 de cada agrupamento através da construção de gráficos de dispersão. Nesta classificação foi traçada uma linha reta aleatória entre os clusters de interesse utilizando o software ORIGIN 7.0.

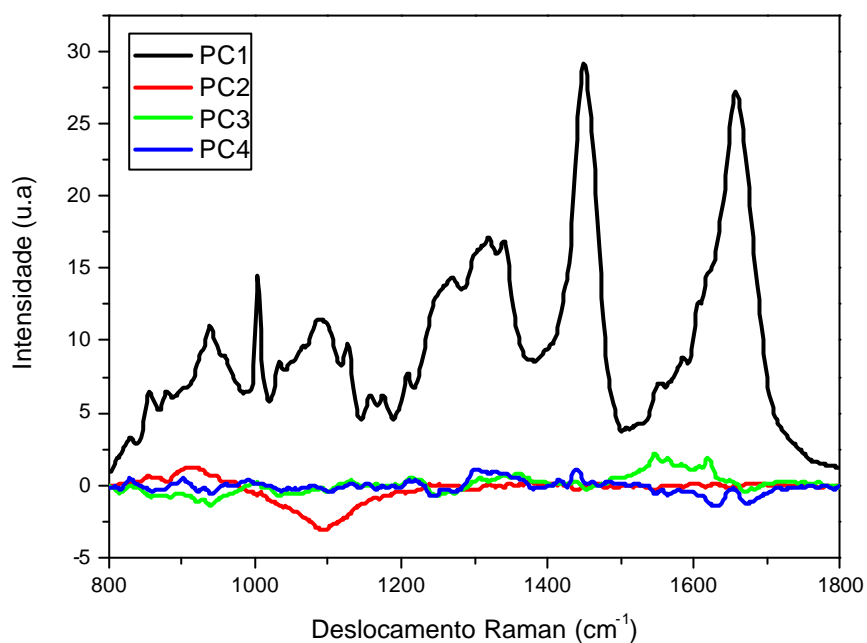


Gráfico 2 - Principal Componente 1, Principal Componente 2, Principal Componente 3 e Principal Componente 4 obtidos do espectro Raman.

No Gráfico 3 estão os gráficos binários plotados do PC1 versus PC2. Para separar claramente os tipos de tecido, uma linha empírica de diagnóstico baseada na melhor separação visual foi traçada.

Como pode ser visto nos Gráficos 3, 4 e 5, esta linha pode identificar e separar corretamente os dois tipos de tecido, mostrando alta sensibilidade e especificidade.

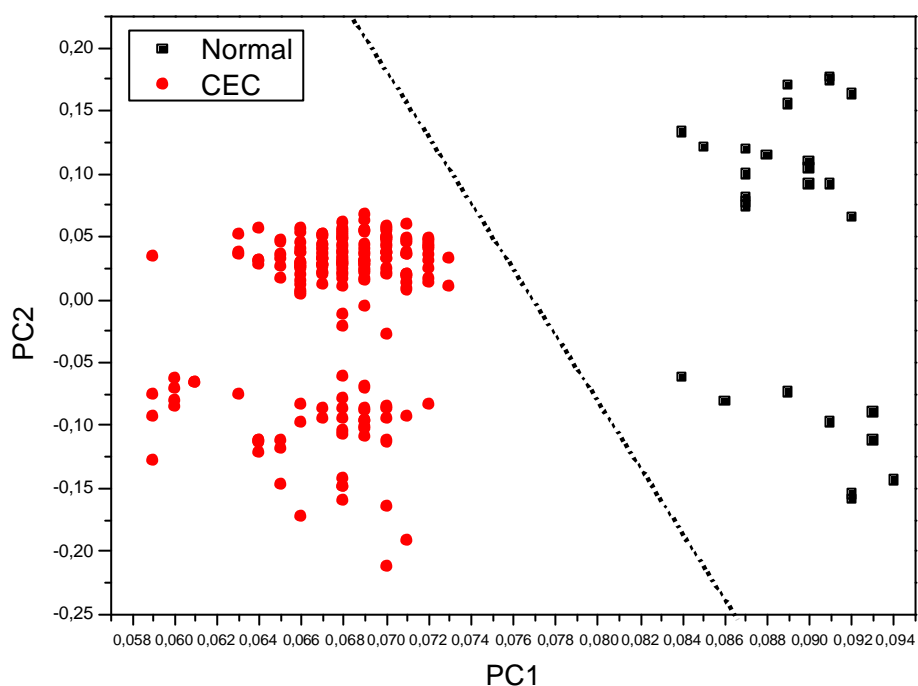


Gráfico 3 - Escores do Principal Componente 1 versus 2 (PC1 X PC2) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo. A linha empírica de diagnóstico, nesta figura, separa o tecido normal do CEC.

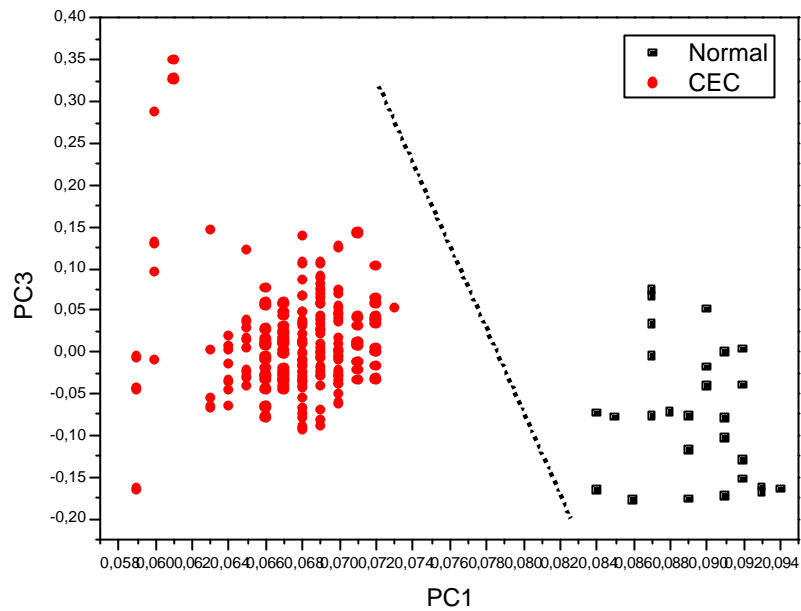


Gráfico 4 - Escores do Principal Componente 1 versus 3 (PC1 X PC3) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo. A linha empírica de diagnóstico, nesta figura, separa o tecido normal do CEC.

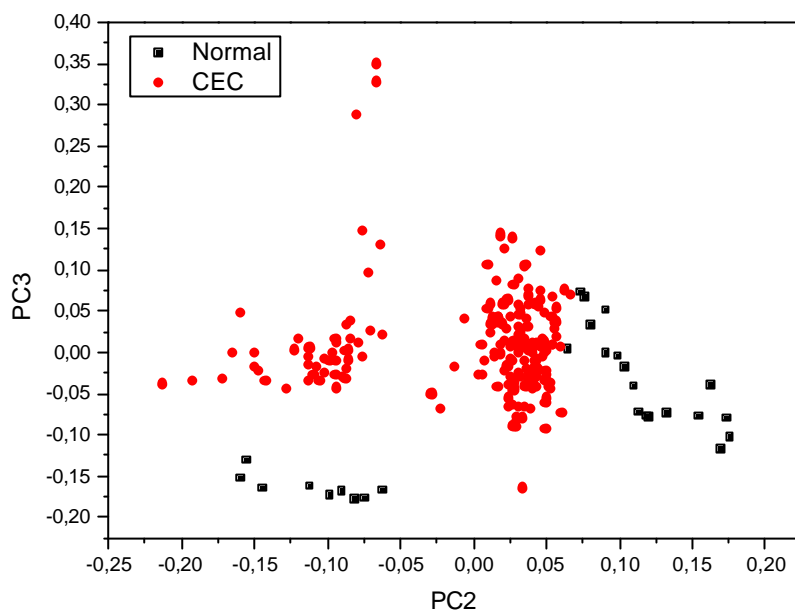


Gráfico 5 - Escores do Principal Componente 2 versus 3 (PC2 X PC3) para todos os espectros FT-Raman utilizados neste estudo.

*Discussão*

## 4 DISCUSSÃO

Vários estudos analisaram métodos de diagnóstico óptico de tecidos em região de cabeça e pescoço, como por exemplo, a endoscopia de contato que permite visualização direta da morfologia celular<sup>38,39</sup>, a espectroscopia de fluorescência que é limitada pois depende de drogas fotossensibilizadoras.<sup>40</sup> Também, foram estudadas técnicas de autofluorescência que não requerem fotossensibilizadores, entretanto, a maioria dos estudos não apresentou diferenças significativas entre o tecido normal e o tumoral.<sup>6,20,26,41-47</sup>

Por outro lado, a espectroscopia Raman apresenta vantagem potencial sobre essas outras técnicas, pois analisa as alterações bioquímicas dos tecidos<sup>13</sup> e pode prover uma impressão digital molecular da substância analisada.<sup>47</sup> Porém, o sinal Raman de tecido mole é fraco<sup>20</sup> e requer tecnologia sofisticada para detecção. Além disso, o sinal pode ser obscurecido pela autofluorescência que também é induzida através de excitação molecular, mas ela pode ser reduzida aumentando o comprimento de onda da luz incidente.<sup>26,47</sup>

Vários estudos têm investigado a utilização da Espectroscopia Raman no diagnóstico de vários tipos de cânceres,<sup>1-3,5,10,13,17,19-33,48</sup> além da sua utilização na detecção de alterações tumorais.<sup>12,34,35</sup>

A espectroscopia FT-Raman oferece vantagens em relação a outras técnicas ópticas como emprego de fontes luminosas NIR, supressão da fluorescência, dessa forma, identificando sinais Raman fracos, não requer preparação de amostra, não sofre influência através de faixas de água, podendo ser utilizada de forma não invasiva para diagnósticos *in situ* e em tempo real.<sup>5,20,28</sup>

Além disso, a excitação próxima ao infravermelho, a 1064nm, também minimiza a fotodegradação da amostra, permitindo o emprego de densidades maiores para compensar o sinal Raman fraco gerado por comprimentos de ondas longas.<sup>36</sup> Ao mesmo tempo o uso do método da Transformada de Fourier (FT) e o acoplamento do espectrômetro aos sistemas de aquisição de dados e processamento em computadores, permitiu as investigações rotineiras de sistemas biológicos pela Espectroscopia Raman.<sup>49</sup>

Esse método é capaz de detectar alterações iniciais nos tecidos, sendo de extrema importância,<sup>20</sup> tanto pelo diagnóstico quanto pela rapidez em realizá-lo.<sup>5</sup>



Devido à grande diversidade celular que compõem a boca o tamanho da peça analisada pelo FT-Raman pode apresentar diferenças espectrais que correspondem a vários componentes celulares, como glândulas, músculos, conjuntivo, periósteo e gordura. A influência dessas variáveis fizeram com que este estudo iniciasse a partir do exame histológico, conforme também descrito por Lau *et al*, 2003, que sugerem que estudos *in vivo* podem suprimir tais variações.<sup>47</sup>

Neste estudo, as amostras foram colhidas e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido a 196°C negativos com a finalidade de manter seu estado bioquímico no momento da excisão.<sup>50</sup>

Como a interpretação visual dos espectros depende muito da experiência do examinador, o diagnóstico através desse tipo de interpretação é difícil, podendo ser impreciso para indivíduos não experientes. Assim, um grande número de trabalhos passou a utilizar análises multivariadas.<sup>51</sup>

A PCA pode ser usada efetivamente para classificação de lesões, desde que cada componente principal tenha uma característica espectral e os scores representem a magnitude destas características correlacionadas a análise histopatológica do tecido. Desse modo, pode-se extrair as informações espectrais de maneira fácil e interpretar as diferenças bioquímicas entre os tipos de tecidos de forma quantitativa.<sup>3,51</sup>

Os PCs escolhidos promoveram diferenciação adequadamente entre os espectros, diferenciando o tecido normal do CEC. O gráfico 2 mostra as curvas dos PCs (PC1, PC2, PC3 e PC4), onde as intensidades positivas de todas as faixas principais estão em posição idêntica a do espectro do tecido normal. Este resultado exibiu características importantes na diferenciação do tecido normal e do CEC. O gráfico 3, do PC1 associado ao PC2, foi o que apresentou maior discrepância, mostrando a eficácia da espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do CEC de boca.

Os dados de Malini e colaboradores (2006)<sup>3</sup> foram semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Apesar dos resultados obtidos serem promissores, mais estudos devem ser realizados, não só quanto ao CEC de boca, para que seja reduzida a interferência das variáveis celulares nos espectros e, conseqüentemente, dando maior confiabilidade ao diagnóstico.

*Conclusão*

## **5 CONCLUSÃO**

Nas condições deste trabalho, os resultados encontrados permitem concluir que:

- A PCA apresentou adequada aplicação na análise dos espectros do tecido normal e do CEC.

# *Referências*

**6 REFERÊNCIAS\***

1. Yan XL, Dong RX, Zhang L, Zhang XJ, Zhang ZW. Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2005;11:3290-3292.
2. Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *Int J Cancer* 2003;107:1047-1052.
3. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers* 2006;81:179-193.
4. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995;45:8-30.
5. Krishna CM, Sockalingum GD, Kurien J, Rao L, Venteo L, Pluot M et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Appl Spectrosc* 2004;58:1128-1135.
6. Manjunath BK, Kurein J, Rao L, Krishna CM, Chidananda MS, Venkatakrishna K et al. Autofluorescence of oral tissue for optical pathology in oral malignancy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:49-58.

7. Wong YK, Tsai WC, Lin JC, Poon CK, Chao SY, Hsiao YL et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. *Oral Oncol* 2006;42:893-906.
8. Partridge M. Oral cancer: 2. Clinical presentation and use of new knowledge about the biology of cancer to establish why tumours may recur. *Dent Update* 2000;27:288-294.
9. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002;68:617-621.
10. Stone N, Stavroulaki P, Kendall C, Birchall M, Barr H. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. *Laryngoscope* 2000;110:1756-1763.
11. Manoharan R, Wang Y, Feld MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A* 1996;52:215-249.
12. Murali Krishna C, Prathima NB, Malini R, Vadhiraja BM, Bhatt RA, Fernandes DJ et al. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix. *Vibrational Spectroscopy* 2006;41:136-141.
13. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12371-12376.
14. Elston CW, Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S et al. Causes of inconsistency in diagnosing and classifying

- intraductal proliferations of the breast. European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. *Eur J Cancer* 2000;36:1769-1772.
15. Tsuda H, Akiyama F, Kurosumi M, Sakamoto G, Watanabe T. Monitoring of interobserver agreement in nuclear atypia scoring of node-negative breast carcinomas judged at individual collaborating hospitals in the National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (NSAS-BC) protocol. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29:413-420.
16. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss* 2004;126:141-157; discussion 169-183.
17. Choi J, Choo J, Chung H, Gweon DG, Park J, Kim HJ et al. Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy. *Biopolymers* 2005;77:264-272.
18. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *Jama* 1989;261:737-743.
19. Short MA, Lui H, McLean D, Zeng H, Alajlan A, Chen XK. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006;11:34004.
20. Swinson B, Jerjes W, El-Maaytah M, Norris P, Hopper C. Optical techniques in diagnosis of head and neck malignancy. *Oral Oncol* 2006;42:221-228.



21. Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer* 2006;94:1460-1464.
22. Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, Nazemi J, Lyons J, Hicks D et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using raman spectroscopy. *Cancer Res* 2006;66:3317-3322.
23. Dacosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:41-57.
24. Chen K, Qin Y, Zheng F, Sun M, Shi D. Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. *Opt Lett* 2006;31:2015-2017.
25. Short KW, Carpenter S, Freyer JP, Mourant JR. Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophys J* 2005;88:4274-4288.
26. Lau DP, Huang Z, Lui H, Anderson DW, Berean K, Morrison MD et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: preliminary findings. *Lasers Surg Med* 2005;37:192-200.
27. de Veld DC, Bakker Schut TC, Skurichina M, Witjes MJ, Van der Wal JE, Roodenburg JL et al. Autofluorescence and Raman microspectroscopy of tissue sections of oral lesions. *Lasers Med Sci* 2005;19:203-209.

28. DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Optical techniques for the endoscopic detection of dysplastic colonic lesions. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:70-79.
29. Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002;119:64-69.
30. Dacosta RS, Wilson BC, Marcon NE. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S85-104.
31. Gniadecka M, Wulf HC, Nielsen OF, Christensen DH, Hercogova J. Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions: studies by Raman spectroscopy. *Photochem Photobiol* 1997;66:418-423.
32. Frank CJ, Redd DC, Gansler TS, McCreery RL. Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy. *Anal Chem* 1994;66:319-326.
33. Verma SP, Wallach DF, Philippot JR, Zanca M, Bonnet B. Abnormal Raman scattering by plasma of patients with cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:587-589.
34. Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Utzinger U, Richards-Kortum R. Development of a fiber optic probe to measure NIR

Raman spectra of cervical tissue in vivo. *Photochem Photobiol* 1998;68:427-431.

35. Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Malpica A, Thomsen S, Utzinger U et al. Near-infrared Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photochem Photobiol* 1998;68:123-132.

36. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol* 2000;45:R1-59.

37. Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H et al. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers* 2002;67:1-9.

38. Andrea M, Dias O, Santos A. Contact endoscopy of the vocal cord: normal and pathological patterns. *Acta Otolaryngol* 1995;115:314-316.

39. Andrea M, Dias O, Santos A. Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:333-339.

40. Profio AE, Doiron DR. Transport of light in tissue in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1987;46:591-599.

41. Dhingra JK, Perrault DF, Jr., McMillan K, Rebeiz EE, Kabani S, Manoharan R et al. Early diagnosis of upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:1181-1186.

42. Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R, Kemp B, El-Naggar AK, Palmer JL et al. Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1251-1258.
43. Schantz SP, Kolli V, Savage HE, Yu G, Shah JP, Harris DE et al. In vivo native cellular fluorescence and histological characteristics of head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1177-1182.
44. Betz CS, Mehlmann M, Rick K, Stepp H, Grevers G, Baumgartner R et al. Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg Med* 1999;25:323-334.
45. Harries ML, Lam S, MacAulay C, Qu J, Palcic B. Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumours using the helium-cadmium laser. *J Laryngol Otol* 1995;109:108-110.
46. Delank W, Khanavkar B, Nakhosteen JA, Stoll W. A pilot study of autofluorescent endoscopy for the in vivo detection of laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2000;110:368-373.
47. Lau DP, Huang Z, Lui H, Man CS, Berean K, Morrison MD et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings. *Lasers Surg Med* 2003;32:210-214.

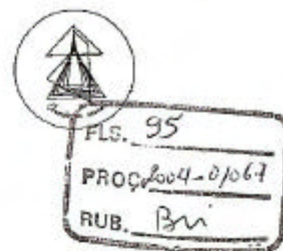
48. Bittar RA, Martin AA, Mourao Neto M, Soares FA. FT-Raman spectroscopy study of human breast tissue. . Biomedical Vibrational Spectroscopy 2004;5321:190-195.
49. Keller S, Schrader B, Hoffmann A, Schrader W, Metz K, Rehlaender A et al. Application of Near-Infrared-Fourier Transform Raman Spectroscopy in Medical Research. Journal of Raman Spectroscopy 1994;25:663-671.
50. Shim MG, Wilson BC. The effects of ex vivo handling procedures on the near-infrared Raman spectra of normal mammalian tissues. Photochem Photobiol 1996;63:662-671.
51. Martin AA, Bittar RA, Nunes LO, Arisawa E, Silveira Júnior L. Principal components analysis of FT-Raman spectra of ex vivo basal cell carcinoma. Biomedical Vibrational Spectroscopy 2004;5321:198-203.

*Anexos*

**ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-**

OF. 0101/2004  
CEP  
ACBD/bri

Araçatuba, aos 21 de setembro de 2004.

**Referência Processo FOA 2004-01067**

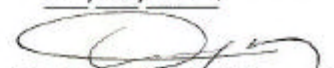
O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **“Espectroscopia FT-Raman no diagnóstico do carcinoma espinocelular de mucosa bucal. Estudo “ex-vivo” em humanos”**, expede o seguinte parecer:

**Aprovado:**

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, **deverá ser enviado relatórios parciais até 15/09/2005, 15/09/2006 e relatório final até 15/09/2007.**

  
**Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**  
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor  
**Prof. Dr. EDER RICARDO BIASOLI**  
Campus de Araçatuba-SP-

**Ciente.De acordo.**  
*21/09/2004*  
  
**Dr. Eder Ricardo Biasoli**

## **ANEXO II – Normas para publicação da Revista Oral Oncology**

### **Oral Oncology**

#### **Guide for Authors Submission checklist**

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please contact the Author Support Department at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)

It is essential to give a fax number and email address when submitting a manuscript. Articles must be written in good English.

#### **Prior to Submission**

*Oral Oncology* will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

Authors are advised to read these guidelines.



*Previous Publication*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

*Ethics*

For clinical trials, details of ethical committee approval and the type of informed consent should be stated. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

*Conflict of Interest*

At the end of text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work.

*Role of the Funding Source*

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

*Authorship and Acknowledgments*

A covering letter, signed by **all** authors, should accompany the submitted manuscript. This letter must contain the statement that the manuscript has been "**read and approved by all authors**".

Authors are required to identify the contributions for which they are responsible. The author responsible for the integrity of the entire study should be identified. Please list the following phrases and beside each indicate the name(s) of the author(s) to whom they apply:

- 1 Guarantor of integrity of the entire study
- 2 Study concepts
- 3 Study design
- 4 Definition of intellectual content
- 5 Literature research
- 6 Clinical studies
- 7 Experimental studies
- 8 Data acquisition
- 9 Data analysis
- 10 Statistical analysis
- 11 Manuscript preparation
- 12 Manuscript editing

13 Manuscript review

**Items that do not apply should be indicated.**

In addition, written permission from the following parties should accompany the manuscript: a) those named in the acknowledgments who have been credited with a scientific contribution to the work, b) those cited in the manuscript as personal communications.

*Copyright*

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage

(<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

*US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy*  
Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

*Authors' Rights*

As an author you (or your employer or institution) may do the following:  
- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use  
- make copies and distribute such copies (including

- through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
  - post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
  - present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
  - for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
  - retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
  - include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
  - use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
  - prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Submission to *Oral Oncology* and *Oral Oncology EXTRA* proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "Guide for Authors" section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

#### **General Points**

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://authors.elsevier.com>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

#### **Presentation of Manuscript**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

#### *Language Polishing*

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: [http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions)

Provide the following data on the title page:

*Title:* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

*Author names and affiliations:* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the

actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

*Corresponding Author:* Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

*Present/permanent address:* If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

*Abstract:* A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. A structured abstract is required. For this, a recent copy of the journal should be consulted. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

*Keywords:* Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes.

*Abbreviations:* Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article/

*Text:* This should start on the third page and should be subdivided into the following sections: Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, and Discussion.

*References:* Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. "Unpublished data" and "Personal communications" are not allowed. As an alternative, say in the text, for example, '(data not shown)' or '(Dr F.G. Tomlin, Karolinska Institute)'. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference numbers must always be given.

Number the references (numbers in square brackets) in the reference list in the order in which they appear in the text.

Examples:

1. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - Comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37(5):401-418.
2. Gullick WJ, Venter DJ. The c-erbB2 and its expression in human tumors. In: Waxman J, Sikora K, editors. *The molecular biology of cancer*. Oxford: Blackwell Scientific, 1989. p. 38-53.
3. Scully C, Cawson RA. *Medical Problems in Dentistry*. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1998

For more than 6 authors that first 6 should be listed followed by "et al". For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997; 277 : 927-934) (see also [http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)).

#### **Figure Captions, Tables, Figures and Schemes**

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### *Nomenclature and Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

#### *Preparation of Electronic Illustrations*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.

- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to colour reproduction in print.

#### *Captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a

description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Line drawings*

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

#### *Photographs (halftones)*

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Note that photocopies of photographs are not acceptable.

#### *Preparation of supplementary data*

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

#### **Proofs**

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be



possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

**Author Enquiries**

Visit the Author Gateway from Elsevier <http://authors.elsevier.com> for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you when an article's status changes. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, and answers to frequently asked questions.

## **ANEXO III – Conceitos básicos sobre Espectroscopia.**

### ***Espectroscopia Molecular***

A Espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. De maneira direta, são obtidas as diferenças entre estes níveis de energia a partir de medidas que determinam as posições relativas dos níveis energéticos. No caso das moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis energéticos envolvidos: eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais, assim, as vibrações moleculares podem ser medidas por diferentes técnicas como a Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho; Espectroscopia Raman, e variáveis destas mesmas técnicas (SALA, 1995).

### **Espectroscopia Raman**

As técnicas espectroscópicas, de uma maneira geral, fornecem informações detalhadas sobre os níveis de energia dos espécimes em estudo. Particularmente, no caso da espectroscopia vibracional Raman, a grande vantagem reside na aquisição de uma maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracional

frente aos níveis de energia eletrônicos. Enquanto os espectros eletrônicos, conhecidos como fluorescência, são constituídos por bandas largas e usualmente sem estrutura, os vibracionais Raman representam a “impressão digital” das moléculas (FARIA; SANTOS, 1997).

### **Efeito Raman**

O Efeito Raman é o espalhamento inelástico da luz produzido por íons, átomos e moléculas, relacionado à mudança de frequência da luz incidente quando espalhada. Quando um feixe de luz monocromática incide em uma molécula cujas dimensões são menores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre o fenômeno do espalhamento. Uma parte da energia monocromática dos fótons incidentes é transferida para as moléculas de tal maneira que alguns dos elétrons pertencentes aos diferentes níveis de energia se tornam então excitados, ocorrendo aumento na frequência de vibração de algumas ligações desta molécula. Para esta molécula voltar ao seu estado fundamental, mais estável que o estado excitado, existe a necessidade de que esta energia seja entregue novamente ao meio. Esta variação na frequência entre a energia emitida e a espalhada pela molécula é um fenômeno dependente da massa da molécula e dos tipos de ligações que a constitui. A estrutura da molécula, massa atômica, tipos de ligações, substitutos moleculares, geometria molecular e pontes de hidrogênio afetam a constante de força vibracional que dita a vibração molecular.

Sendo assim, existem diversos movimentos que constituem o conjunto de modos vibracionais normais, entre estes podemos citar: modo de estiramento entre duas ligações atômicas; modo de dobramento entre três átomos conectados por duas ligações; modo de deformação fora do plano que muda a estrutura da molécula de plana para angular (SALA, 1995).

A Espectroscopia Raman é fundamentada no fenômeno de mudança de frequência da luz quando esta é espalhada pelas moléculas. Uma dada frequência de uma luz incidente é  $\nu_0$  e a frequência da luz espalhada por uma molécula é  $\nu_r$ , a variação de frequência incidente e espalhada pode ser entendida por:

$$\Delta\nu = \nu_r - \nu_0$$

A frequência de deslocamento Raman é equivalente a mudança de energia  $h\Delta\nu$ . Os resultados observados são usualmente expressos em termos de número de ondas (*wavenumbers*) e não frequência.

### **Espalhamento Raman**

A maior parte da luz espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da luz incidente, e este espalhamento é conhecido como espalhamento elástico ou Rayleigh. Uma pequena parcela desta luz espalhada, no entanto, apresenta um comprimento de onda diferente daquele da luz incidente, e a sua existência constitui espalhamento

inelástico ou Raman. A proporção de fótons espalhados inelasticamente em relação aos espalhados elasticamente é da ordem de  $10^{-7}$ , o que torna a sua detecção problemática em algumas situações. Estas mudanças de freqüências estão diretamente relacionadas à quantidade de energia de excitação das partículas que são distintas para cada tipo de moléculas.

Filtrando-se a linha Rayleigh, de freqüência conhecida, pelo fato de se utilizar uma luz monocromática como fonte de excitação moléculas, obtem-se somente as freqüências espalhadas inelasticamente. Assim, a energia vibracional de diversos materiais pode ser deduzida e a estrutura de suas partículas identificada através do espectro Raman.

No processo de espalhamento, um fóton de energia é destruído e simultaneamente um fóton espalhado de energia é criado. No espalhamento Raman a radiação que interage com a molécula é espalhada com freqüência ligeiramente modificada. Esta variação de freqüência corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais. A interação, entretanto, pode ser inelástica, a qual leva a matéria para um nível de energia excitado, o que resulta em uma perda de energia do fóton, e este é espalhado com freqüências menores que a incidente, sendo estas freqüências Raman são conhecidas como linhas *Stokes*. Se a matéria está em um estado excitado, a colisão com um fóton pode causar uma perda de energia e os elétrons sofrem uma transição

para um estado de energia mais baixa. Neste caso, as frequências Raman são conhecidas como *Anti-Stokes* (SALA, 1995).

### **Polarizabilidade**

Para um modo vibracional ser Raman ativo existe a necessidade da variação da polarizabilidade da molécula durante a vibração, isto é, o momento de dipolo a ser considerado é induzido pela radiação eletromagnética. O campo elétrico produzido pelo feixe de luz monocromática polariza os elétrons da molécula em ressonância, promovendo a deformação da nuvem eletrônica molecular. Nesta distorção, a carga positiva do núcleo é atraída em direção oposta ao pólo negativo do campo elétrico, o elétron em direção oposta ao pólo positivo. Esta separação de cargas causa uma indução no momento dipolo e se diz que a molécula está polarizada (SALA, 1995).

O campo elétrico produzido pela molécula polarizada oscila na mesma frequência da onda passante, então a molécula age como uma fonte de radiação própria emitindo fótons para todas as direções (SALA, 1995).

Se a polarização é constante, o espalhamento é elástico; se a molécula muda sua polarizabilidade, ou seja, muda o centro de carga, então, o espalhamento é inelástico, ou Raman.

### **Instrumentação em Espectroscopia Raman**

Espectroscopia Raman requer o uso de fontes de luz monocromáticas, ou seja, com um único comprimento de onda, visto que é baseada no deslocamento da frequência a partir da luz incidente, que é muito pequena e pode ser obscurecida por uma fonte de largos comprimentos de onda.

Espectroscopia Raman pode ser classificada baseada por sua fonte de luz utilizada, como por exemplo: Ultra-Violeta (UV), Visível e Infra-Vermelho (IR). Para a maioria das aplicações da Espectroscopia Raman na área Biológica/ Biomédica, fontes de excitação no infravermelho são mais utilizadas devido à propriedade física de conseguir diminuir virtualmente a emissão de autofluorescência de, por exemplo, enzimas presentes nos os tecidos biológicos. Os *lasers* mais comuns usados pela Espectroscopia Raman no infravermelho são: Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada (Nd: YAG) e Titânio-Safira (Ti: Safira) (SALA, 1996). Quando uma luz monocromática no comprimento de onde visível, ou até mesmo em 780nm, são utilizadas como fonte de excitação para o efeito Raman, estas linhas fracas geralmente são encobertas pela radiação de fluorescência emitida por constituintes celulares, como enzimas, que estão sempre presentes mesmo em concentrações muito baixas. Para driblar este obstáculo, diminui-se a energia quântica da fonte de excitação para um grau tal que somente os níveis vibracionais são excitados, não os níveis eletrônicos. Com excitação a 1064 nm a partir de um *laser* de Nd:

YAG, por exemplo, esta fluorescência é virtualmente eliminada (SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER, 1997).

Espectroscopia Raman também pode ser classificada de acordo com tecnologia empregada, por exemplo: Transformada de Fourier (FT-Raman) ou de Sistema Dispersivos. O Sistema FT-Raman tem inúmeras vantagens sobre o Sistema Dispersivo, incluindo a vantagem “multiplex” o qual lidera a capacidade de coletar vários comprimentos de onda em um curto período de tempo. No entanto, a Espectroscopia Raman Dispersiva tem se tornado muito mais popular desde o advento de um detector CCD (*Charge Couple Device Detector*) devido ao alto ganho de eficiência quântica. A partir desta tecnologia, provavelmente serão desenvolvidos os equipamentos para coleta de espectros Raman *in vivo*, a atual dificuldade é a baixa sensibilidade do detector CCD nos comprimentos de onda de excitação acima de 830 nm (SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER, 1997).

### ***Espectroscopia FT-Raman***

Sinais Raman obtidos a partir de amostras biológicas são extremamente fracos, e a emissão de fluorescência acaba sendo a maior interferência para as medidas de Espectroscopia Raman (ALCANTARA,



2002). No Raman convencional onde para excitação geralmente se utilizam *lasers* de radiação visível, cerca de 90% das amostras que contém impurezas produzem forte fluorescência, mascarando assim, o sinal Raman (ANGEL et al., 1995). Para remover esta fluorescência indesejável no espectro Raman, utilizam-se diversas técnicas como, por exemplo, a Espectroscopia Raman Anti-Stokes Coerente (CARS). Este método, porém, requer um sistema óptico complexo e muito caro, não sendo, portanto, um método de primeira escolha. A melhor opção para esta situação é a Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) utilizando como fonte de excitação o laser de Nd: YAG no comprimento de onda de 1064 nm que mantém a maioria das bandas de absorção dos fluoróforos fora do espectro Raman. Na região do comprimento de onda de 1000 a 1300 nm, o método de FT-Raman promove a maior sensibilidade óptica devido ao sistema multiplex do espectrômetro FT (ALCANTARA, 2002).

A excitação no infravermelho próximo, a 1064 nm, também minimiza a degradação fotolítica da amostra, permitindo que uma maior potência de incidência do *laser* seja utilizada para compensar o espalhamento Raman menos intenso quando excitado por comprimentos de onda mais longos. Há alguns anos, foi demonstrado que quando se emprega um laser de Nd: YAG como fonte de excitação para o efeito Raman, o número de amostras que fluorescem diminuem enormemente

(SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER, 1997).

### **Transformada de Fourier**

O interesse em métodos de processamento digital de imagens vem principalmente de duas áreas de aplicações: para melhoria da informação para interpretação humana e para o processamento de dados em computador. A Transformada Discreta de Fourier Bidimensional, desenvolvida por Jean Baptiste Joseph Fourier, um matemático francês, se tornou uma ferramenta matemática de grande aplicabilidade na solução dos problemas de processamento digital de imagens, ou seja, promove a mudança do domínio do tempo ou espaço  $(x, y)$  para o domínio da frequência facilitando, assim, o seu processamento digital da imagem (FONSECA NETO; ALCO CER, 1998).

### **REFERÊNCIAS**

ALCÂNTARA, P. Espectroscopia Molecular. Curso Física Moderna II. Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, p.1-5, 2002.

ANGEL, S.M.; CARRABBA, M; COONEY T.F. The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy. Spectrochim. Acta A. Mol Spectrosc., n.51, p. 1779-99, 1995.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G C. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, n.20, v.3, p.319-23, 1997.

FONSECA NETO, J.; ALCO CER, P. R. C. Compressão de Imagens Médicas Utilizando a Técnica JPEG-DPCM, IV Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde, p. 411-2, Curitiba, 1998.

SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1995. 224 p.

SCHRADER, B. et al. NIR FT Raman spectroscopy - a new tool i medical diagnosis. *J. Mol Struct.*, n.408, v.1, p.23-31, 1997.

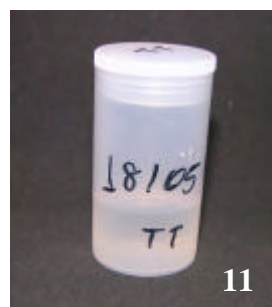
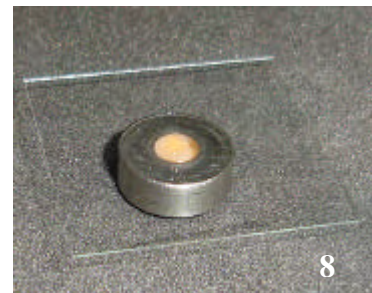
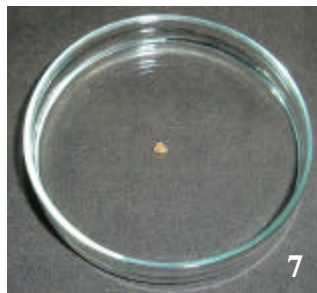
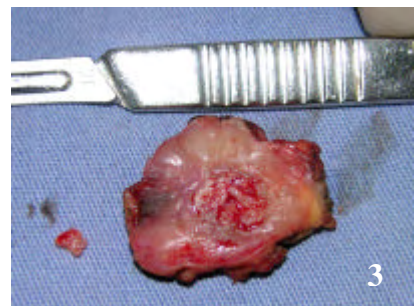
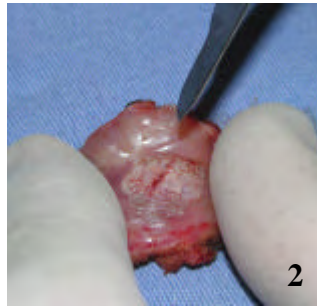
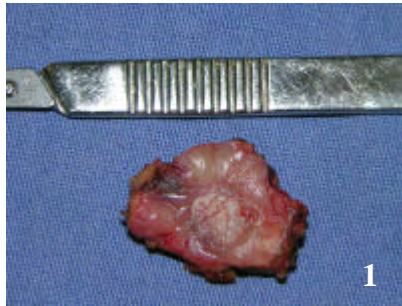
SCHRADER, B. *Infrared and Raman Spectroscopy*. New York: VCH Publishers , 1995. Cap.4

SCHRADER, B. *Raman/ Infrared Atlas of Organic Compounds*. Alemanha: VCH Verlagsgesellschaft, 1989. 1118p.

SCHRADER, B.; MOORE, D.S. Laser-based molecular spectroscopy for chemical analysis: Raman scattering process, IUPAC Recommendations. 1997. <http://www.iupac.org/reports/V/spectro/partXVIII.pdf> . Acesso em: 02/04.

## **ANEXO IV - Rotina dos procedimentos para realização da espectroscopia:**

- 1 - Fragmento de biópsia de Carcinoma Espinocelular de mucosa de boca.
- 2 - Delimitação do fragmento que será encaminhado para espectroscopia.
- 3 - Fragmento de biópsia dividido em duas partes, uma seguiu a rotina de procedimentos para diagnóstico e a outra para a espectroscopia.
- 4 - Armazenamento da amostra em tubo criogênico de 1,2 ml Nalgene® devidamente identificado e numerado.
- 5 - Estocagem dos tubos contendo as amostras em galão de nitrogênio líquido, numa temperatura de 196°C negativos.
- 6 - Materiais utilizados para realização da espectroscopia.
- 7 - Descongelamento individual dos fragmentos em solução de soro fisiológico a 0,9%.
- 8 - Colocação dos fragmentos em porta-amostra de alumínio.
- 9 - Acondicionamento das amostras para análise espectroscópica.
- 10 - FT-Raman Spectrometer RFS 100 da Bruker® (Alemanha) acoplado a um microscópio com laser Nd:YAG emitindo um comprimento de onda em 1064 nm.
- 11 - Acondicionamento das amostras em formol 10% em frascos devidamente identificados e numerados.
- 12- Encaminhamento das amostras para exame histopatológico.



**ANEXO V – Gráficos individuais dos quatro primeiros PCs que compõem o Gráfico 2 da página 42.**

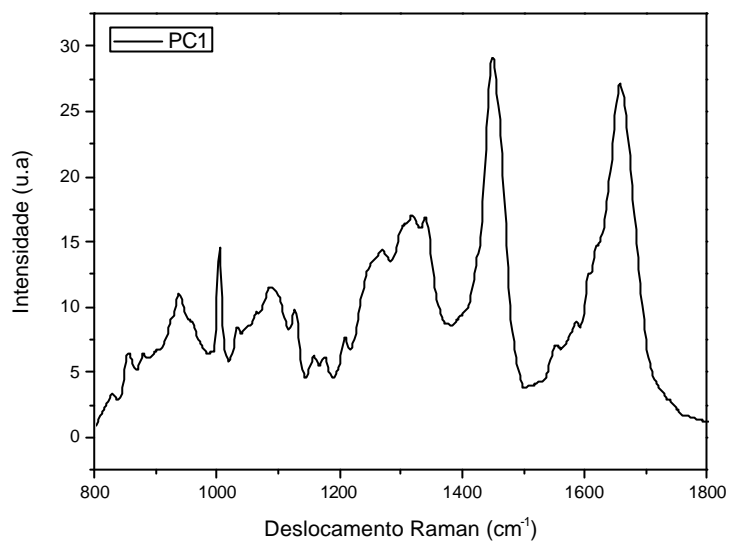


Gráfico 6 - Principal Componente 1, obtido do espectro Raman.

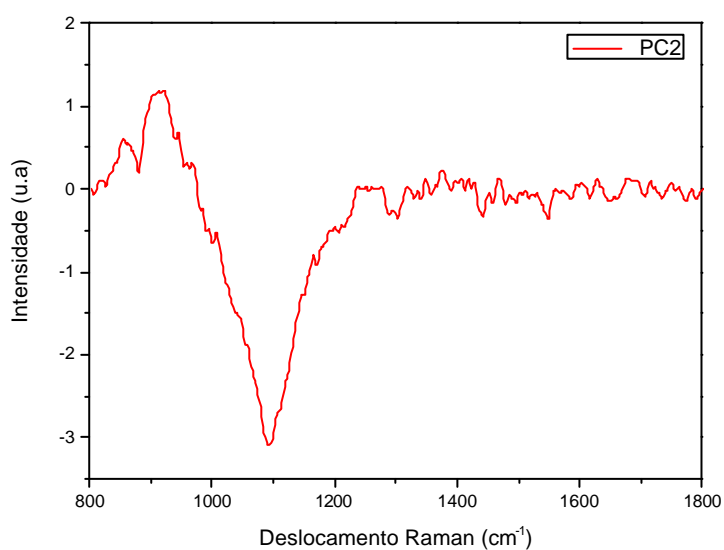


Gráfico 7 - Principal Componente 2, obtido do espectro Raman.

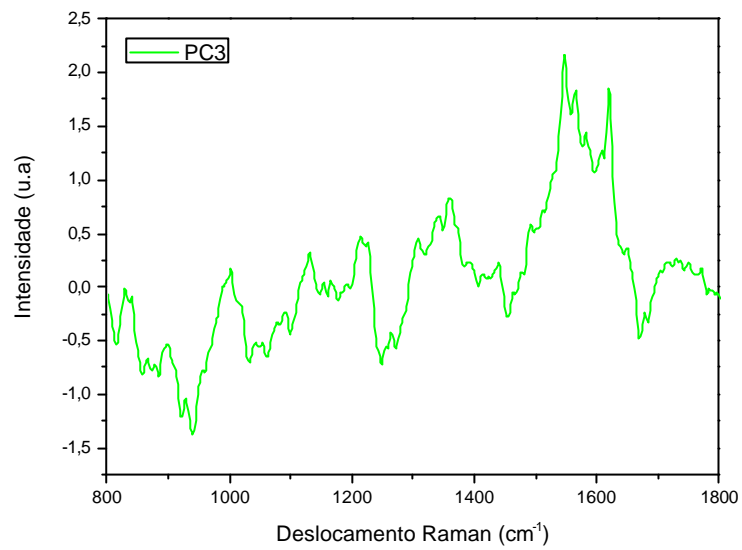


Gráfico 8 - Principal Componente 3, obtido do espectro Raman.

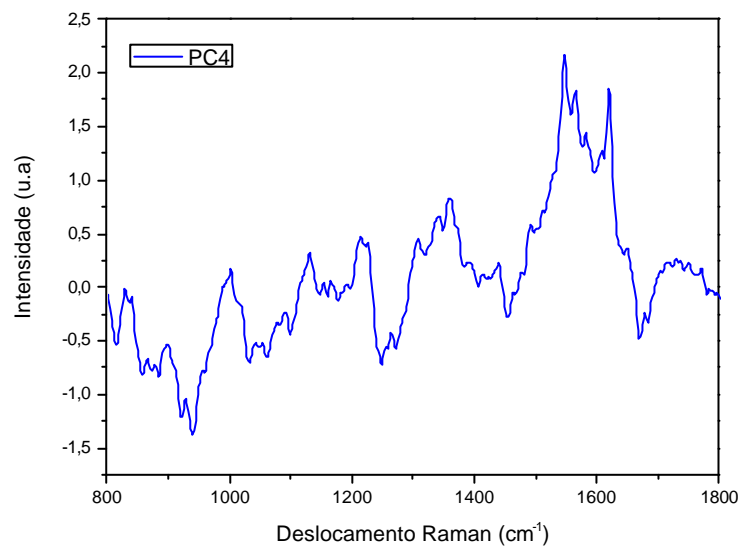


Gráfico 9 - Principal Componente 4, obtido do espectro Raman.