

## CONFIGURAÇÃO ÓTICA DO ESPECTRÔMETRO RAMAN: OTIMIZAÇÃO NA RELAÇÃO SINAL-RUÍDO EM UMA REGIÃO ESPECÍFICA DE INTERESSE CLÍNICO

*João Carlos Lázaro\*, Carlos J. de Lima, Leonardo M. Moreira, Landulfo Silveira Jr., Antonio Balbin Villaverde, Marcos Tadeu T. Pacheco*

Instituto de Pesquisa e desenvolvimento – IP&D – Universidade do Vale do Paraíba.

Av. Shishima Hifumi 2911 – Urbanova, 12244-000- São Jose dos Campos, SP –

\*autor para correspondência: [jcl@univap.br](mailto:jcl@univap.br)

**Resumo-** A análise consiste na otimização do parâmetro de largura mínima de linha espectral que um espectrômetro pode resolver sem distorção ou comprometimento do sinal coletado. Otimizando o sistema de análise para um pico de interesse específico do espectro coletado pelo sistema Raman pode-se buscar uma melhoria na relação sinal ruído. A análise proposta faz parte de um sistema de diagnóstico clínico utilizando laser, portanto uma melhor eficiência na coleta dos espectros, traz por consequência uma redução no tempo de diagnóstico do tecido alvo que é o coronariano calcificado, resultando numa maior eficiência e aumentando assim sua precisão e a margem de segurança para tratamentos “in vivo”.

**Palavras-chave:** Raman, cardiovascular, diagnóstico por laser, instrumentação biomédica.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica, Bioengenharia.

### Introdução

Espectroscopia Raman é uma técnica importante que permite a obtenção de informações precisas sobre as características funcionais de amostras biológicas, o que representa um grande potencial para aplicações médicas de diagnóstico (MANOHARAN et al., 1992). Para este tipo de aplicação, é necessário um excelente sistema de coleta espectrais, o que propicia uma adequada identificação das bandas espectrais obtidas nas diversas técnicas espectroscópicas, tais como espectroscopia Raman. Várias metodologias têm sido empregadas, a fim de melhorar a resolução dos espectros Raman, especialmente com o foco em aplicações biomédicas (MOREIRA et al., 2008). Os procedimentos mais comuns associados à melhoria da resolução espectral em espectroscopia Raman são basicamente correlacionados com o aumento da potência do laser utilizado para irradiar a amostra, aumento do tempo de exposição da CCD (Charge Coupled Device) detetor de intensidade de luz e Aumento da intensidade da luz que penetra na câmera através da abertura da janela ótica.

No primeiro caso, o aumento da potência do laser não é um processo trivial, devido ao elevado custo de lasers com elevada potência específica, que não está disponível para vários laboratórios (HANLON et AL., 2000). No segundo caso, o aumento do tempo de exposição acarretaria num processo longo de coleta de dados, o que seria

contrário ao ponto de vista clínica que é o foco deste trabalho, pois se deseja que o diagnóstico seja feito no menor tempo possível ( PAULA et al., 2005). No terceiro caso verifica-se a possibilidade de se aumentar a largura da fenda ótica do espectrômetro, buscando assim utilizar o maior valor de abertura ótica sem prejudicar a resolução, portanto o sistema deve ser otimizado para análise de um pico de interesse específico do espectro coletado pelo sistema Raman, os outros picos que se apresentarem com largura superior ao do pico de interesse serão analisados sem prejuízo de sua identificação. Para tanto, pode-se obter uma melhoria na relação sinal-ruído e conseqüentemente uma redução no tempo de coleta o que resultará numa maior eficiência do sistema. Também se verifica que a redução da largura da fenda para alguns microns proporciona uma alta resolução na coleta de dados, mas a intensidade do sinal coletado se apresenta muito baixo e dificulta a medida, obrigando a aumentar o tempo de exposição do CCD na coleta, o que recai no segundo caso.

A escolha do pico mais adequado para a otimização da fenda está dependente da amostra analisada, uma vez que para cada tipo de tecido biológico, há moléculas que apresentam bandas vibracionais específicas. Desta forma, o pico escolhido deve ser o mais intenso e representativo. Por exemplo, podemos mencionar o pico de tecidos mineralizados que é encontrada em aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$ , que está associada à hidroxiapatita. Por outro lado, estudando a aterosclerose encontra-se a banda

relacionada com o colesterol, cujo pico é encontrado em torno de  $1445 \text{ cm}^{-1}$ , que seria o pico mais adequado para a obtenção de uma excelente SNR (NOGUEIRA et al., 2005). Com efeito, podemos propor esta metodologia de diagnóstico para vários estados patológicos, dependendo das moléculas presentes em cada amostra.

## Materiais e Métodos

O equipamento utilizado para a análise espectral é o espectrógrafo HoloSpec, modelo HS-f/1.8i-NIR com grade de dispersão holográfica VPT™ da Kaiser Optical system. Esse sistema é analisado como uma rede de difração com a faixa de trabalho de 400nm a 1000nm, fornecendo a máxima eficiência no comprimento de onda selecionada. Nesse equipamento o valor mínimo da fenda é  $25 \mu\text{m}$  e o valor máximo é 3 mm. A rede de difração holográfica “Raman gratings” utilizada é para o comprimento de onda de excitação de 830 nm (HSG – 830 LF). O valor da dispersão linear “d” apresentada por esse modelo para a grade de difração holográfica ( Low Frequency Stokes Grating) é 4,9 nm/mm para 830 nm, observada para “ Low Frequency Stokes gratings” de  $400 \text{ cm}^{-1}$  até  $1860 \text{ cm}^{-1}$  (OPERATION MANUAL HOLOSPEC VPT SYSTEM,1994).

A abertura óptica sofrerá variações no parâmetro de abertura da fenda de  $100 \mu\text{m}$  à  $300 \mu\text{m}$ , onde será observado o comportamento da relação sinal-ruído. O Laser de excitação utilizado é o diodo laser de 830 nm especial para Raman, com largura de banda estreita. O espectro considerando é o de tecido calcificado de coronária de coração humano, onde o pico de interesse é o do cálcio ( $962,33 \text{ cm}^{-1}$ ) (SILVEIRA JR.,2001).

A largura mínima de linha instrumental que o equipamento pode resolver, medidos em  $\text{cm}^{-1}$  é dado por  $\Delta\nu$  e expressa pela equação :

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda^2} \cdot d D \quad (1)$$

Onde d é dispersão linear, D é a abertura da fenda e  $\lambda$  é o comprimento de onda do laser de excitação (YOUNG,1998 ). O valor de  $\Delta\nu$  para o sistema, seja para qualquer comprimento de onda coletado através da espectroscopia Raman, deve ser tal que permita a observação do pico mais estreito do espectro sem deformação. Considerando o espectro de tecido calcificado de coronária de coração humano, observado na figura 1.

O pico de interesse nesse espectro é o do cálcio que está centrado em  $962,33 \text{ cm}^{-1}$  e com uma largura de banda FWHM (Full width at Half Maximum) de  $26,17 \text{ cm}^{-1}$  (Largura total à metade do máximo). Assim esta será a menor largura de pico que o sistema deve resolver para esse espectro, isto é, o valor de  $\Delta\nu$  deve ser igual ou menor de  $26,17 \text{ cm}^{-1}$ .

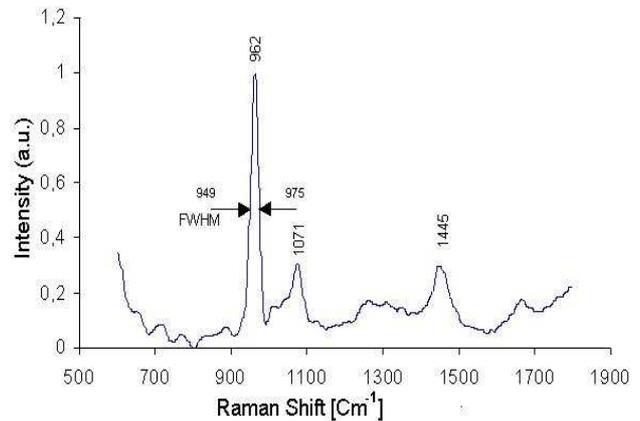


Figura 1 - Espectro Raman de artéria coronariana apresentando pico de cálcio.

## Resultados

Para um deslocamento Raman cujo interesse específico é o pico do cálcio em  $962,33 \text{ cm}^{-1}$ , variando a largura da fenda óptica para valores de 100 a  $300 \mu\text{m}$ , observa-se que o valor de  $\Delta\nu$  varia em função da abertura da fenda óptica. Para a largura da fenda óptica em  $100 \mu\text{m}$ , o valor calculado através da equação 1 para  $\Delta\nu$  é  $6,5 \text{ cm}^{-1}$ , mas se alterarmos a largura de fenda para  $200 \mu\text{m}$  observa-se que para o mesmo valor de deslocamento Raman o valor de  $\Delta\nu$  aumenta para  $12,7 \text{ cm}^{-1}$ , e posteriormente ajustando a fenda para  $300 \mu\text{m}$  o valor de  $\Delta\nu$  passa para  $19,5 \text{ cm}^{-1}$ . Portanto observa-se que o valor de  $\Delta\nu$  aumenta para maiores larguras da fenda óptica, mantendo o mesmo valor do deslocamento Raman. Por outro lado o aumento de  $\Delta\nu$  acarreta uma diminuição da capacidade de resolução do equipamento, pois os picos observados começam a ficar muito largos, escondendo picos de menor expressão, mas de grande importância na análise geral do diagnóstico. No gráfico da figura 2, observa-se claramente que quanto menor a largura da fenda, menor é o valor de  $\Delta\nu$  proporcionando uma maior capacidade de resolução do sistema e conseqüentemente proporciona uma observação mais clara dos picos do espectro.

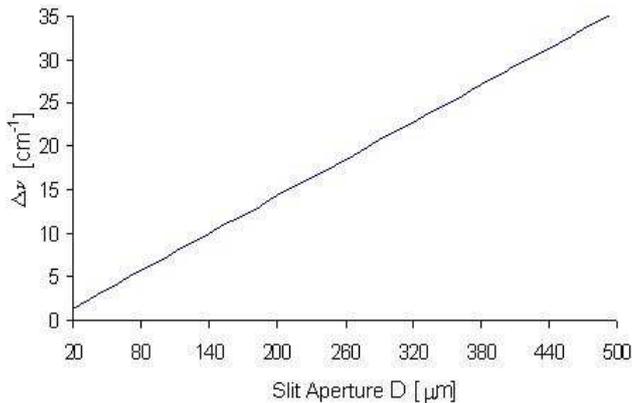


Figura 2 – Gráfico do comportamento de  $\Delta\nu$  pela abertura da fenda no comprimento de onda de 830 nm, com um intervalo de variação da abertura da fenda de 20  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ .

Considerando a variação da potência luminosa que adentra na câmera da CCD e a capacidade de resolução do equipamento  $\Delta_{CRE}$ , pode-se escrever a equação 2 e observar as tendências descritas anteriormente. Assim define-se como *capacidade de resolução do equipamento*  $\Delta_{CRE}$  como sendo o inverso da largura mínima de linha  $\Delta\nu$  (LAZARO J.C., 2004).

Portanto: 
$$\Delta_{CRE} = \frac{1}{\Delta\nu}$$

$$\frac{1}{\Delta\nu} = \frac{1}{\left(\frac{1}{\lambda_R^2}\right) \cdot D \cdot (0,006\lambda_R - 0,1469)} \quad (2)$$

Considerando essas observações, deve-se utilizar o maior valor de  $\Delta\nu$  que ainda permita “resolver” o pico mais estreito do espectro analisado. Isso pode ser observado no gráfico da figura 3, o que proporciona um maior valor da potência transmitida tendo conseqüentemente um aumento na relação sinal ruído.

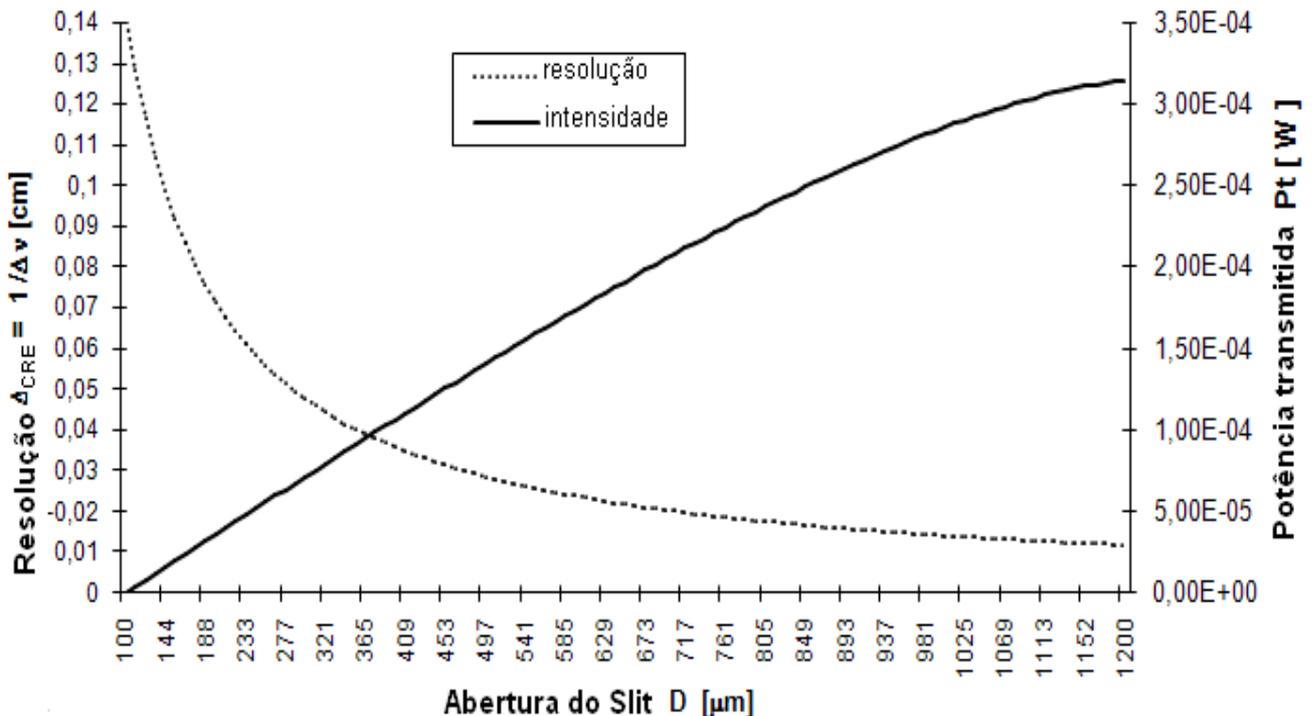


Figura 3 – Gráfico relacionando a capacidade de resolução do equipamento  $\Delta_{CRE}$  e a potência luminosa transmitida através da fenda pela abertura da fenda.

Sendo assim, considerando o pico do tecido calcificado indicado na figura 1, pode-se trabalhar perfeitamente com um  $\Delta v$  de  $26,16 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta_{\text{CRE}} = 0,0382 \text{ cm}$ ) propiciada por uma abertura da fenda de  $367 \mu\text{m}$ , que corresponde pelo gráfico da figura 3 a um valor de potência transmitida  $P_t$  de aproximadamente  $300 \mu\text{W}$ , entretanto para uma abertura da fenda de  $200 \mu\text{m}$ , verifica-se um valor de  $\Delta v$  de  $14,22 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta_{\text{CRE}} = 0,07056 \text{ cm}$ ) que corresponde pela figura 3 a uma potência de  $133 \mu\text{W}$ . Observa-se então que utilizando-se um valor de  $\Delta v$  de  $26,16 \text{ cm}^{-1}$  teremos um incremento de potência de aproximadamente 2,25 vezes o valor de potência transmitida  $P_t$ , obtido para um  $\Delta v$  de  $14,22 \text{ cm}^{-1}$ , tendo-se assim uma relação sinal ruído bem melhor

### Discussão

A intenção da otimização do parâmetro de largura mínima de linha espectral que o equipamento pode resolver ( $\Delta v$ ) traz benefícios na análise dos dados. Quanto maior esse parâmetro mais difícil é para o equipamento resolver duas estruturas que tenham picos próximos. Por outro lado quanto menor esse parâmetro maior capacidade tem o equipamento de resolver estruturas muito próximas. Portanto, a resolução do sistema de diagnóstico Raman para comprimentos de onda considerados deve ser tal que permita a observação do pico mais estreito do espectro, sem a deformação.

Observou-se a dependência do parâmetro  $\Delta v$  inversamente proporcional ao quadrado do comprimento de onda do sinal coletado, e diretamente proporcional à abertura da fenda.

### Conclusões

Através dessa análise verificou-se que a redução da largura da fenda para alguns microns proporciona uma alta resolução para o equipamento, mas a intensidade do sinal coletado será muito baixa, dificultando a medida. Considerando as análises feitas nesse estudo, deve-se, portanto, utilizar o maior valor de resolução  $\Delta v$  que ainda permita resolver o pico mais estreito do espectro analisado, buscando um incremento no sinal observado, obtendo-se assim uma relação sinal ruído bem melhor sem prejudicar a resolução do espectro analisado.

A redução no tempo de diagnóstico do tecido coronariano calcificado resultará numa maior eficiência do sistema de diagnóstico, aumentando assim sua precisão e a margem de segurança para tratamentos "in vivo". Pois para se ter uma utilização eficiente do laser e para evitar que o deslocamento

do cateter provoque a fotoablação de um tecido não analisado, é necessário realizar o diagnóstico do tecido alvo no menor tempo possível.

### Referências:

- MANOHARAN R., J.J. BARAGA, M.S. FELD AND R.P. RAVA, Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy, J. Photochem. Photobiol. B **16** (1992), 211-233.
- MOREIRA L.M, SILVEIRA L. JR., F.V. SANTOS, J.P. LYON, R. ROCHA, R.A. ZÂNGARO, A.B. VILLAVERDE AND M.T.T. PACHECO, Raman Spectroscopy: A Powerful technique for biochemical analysis and diagnosis, Spectroscopy (2008) In Press.
- HANLON E.B., MANOHARAN R., KOO T.W., SHAFER K.E., MOTZ J.T, FITZMAURICE M., KRAMER J.R., I. ITZKAN, DASARI R.R. AND FELD M.S., Prospects for in vivo Raman spectroscopy, Phys. Med. Biol. **45** (2000), R1-R59.
- PAULA A.R. JR. AND SATHAIAH S., Raman Spectroscopy for diagnosis of atherosclerosis: a rapid analysis using neural networks, Medical Engineering & Physics **27** (2005), 237-244.
- NOGUEIRA, G. V.; SILVEIRA JR.; MARTIN A.A.; ZANGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; CHAVANTES, M.C.; PASQUALUCCI, C.A.. **Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery.** Journal Biomed opt., 10(3), art. Nº 31117, 2005.
- LÁZARO, J. C.. Estudo e caracterização de um sistema automático de reconhecimento e retirada de placas ateromatosas utilizando laser/ João Carlos Lázaro. L46e Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, 2004.
- OPERATION MANUAL HOLOSPEC VPT SYSTEM. **Manual de operação do espectroscópio HoloSpec VPT System.** Kaiser Optical Systems, inc. modelo HS- f/1.8i-NIR, serie HS- 0084.17 de outubro de 1994.
- SILVEIRA JR., LANDULFO. **Correlação entre a técnica de espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas. 2001.**
- YOUNG, MATT. **Óptica e lasers.** São Paulo: Edusp, v. 1, 1998.