

Espectroscopia Raman aplicada no estudo de hemácias humanas

Raman spectroscopy applied to the study of human red blood cells

Received: 20-09-2024 | Accepted: 21-10-2024 | Published: 24-10-2024

Mauricio Mitsuo Monção

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0183-1992>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Brasil

E-mail: maurimitsuo@yahoo.com.br

Carina Soares do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0619-8313>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Brasil

E-mail: carinaqmc@gmail.com

Raisa Cavalcante Dourado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1446-0641>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: raisadourado@yahoo.com.br

Roberto Paulo Correia de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7648-728X>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: rpcamtba@gmail.com

ABSTRACT

Raman spectroscopy is an analytical technique capable of providing detailed information about the molecular structure of biological tissues and fluids. Therefore, this article presents a review of Raman spectroscopy applied in studies with human red blood cells in order to synthesize information about the technological aspects and the Raman spectral characteristics identified by different studies. To this end, a search for articles was carried out in the PubMed, LILACS, SciELO and Cochrane databases, using pre-established descriptors, in the search for articles in Portuguese and English, published in the last ten years and available in full. Literature review articles, studies with whole blood, studies with animal red blood cells, and all those that deviate from the scope of the study are excluded. The results demonstrate that different technologies coupled to the Raman system and different technical ranges are used in the analysis of red blood cells. The discussion presents general aspects of the technique and the Raman spectral characteristics of healthy red blood cells and those altered as a result of diseases and other causes. Raman spectroscopy is versatile and widely used in investigations that require evidence at the molecular level of red blood cells.

Keywords: Red blood cells; Raman spectroscopy; Hemoglobin.

RESUMO

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica capaz de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura molecular de tecidos e fluidos biológicos. Sendo assim, este artigo apresenta uma revisão da espectroscopia Raman aplicada nos estudos com hemácias humanas, a fim de sintetizar informações dos aspectos tecnológicos e das características espectrais Raman identificadas em estudos com diferentes propósitos. Para tanto realizou-se um levantamento por artigos nas bases de dados PubMed, LILACS, SciELO e Cochrane, utilizando descritores preestabelecidos, na busca por artigos nos idiomas Português e Inglês, publicados nos últimos dez anos e disponíveis na íntegra. Excluiu-se os artigos de revisão de literatura, pesquisas com amostras de sangue total e hemácias de animais, bem como todos aqueles que se distanciaram do escopo deste estudo. Os resultados demonstram diferentes tecnologias acopladas no sistema Raman e diferentes parâmetros técnicos empregados para análise de hemácias. A discussão aborda aspectos gerais da técnica e das características espectrais Raman de hemácias saudáveis e alteradas em decorrência de doenças e outras causas. A espectroscopia Raman se mostra versátil e com amplo emprego nas investigações que requerem evidências em nível molecular das hemácias.

Palavras-chave: Hemácia; Espectroscopia Raman; Hemoglobina.

INTRODUCTION

O sangue é um fluido vital, responsável por inúmeras funções fisiológicas. É composto pelo plasma, no qual um grande número de células denominadas hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas se encontram suspensas (DEAN, 2005). De forma simplista, as hemácias transportam oxigênio e dióxido de carbono entre as células e os pulmões, e dentro da normalidade, representam cerca de 45% do volume total do sangue circulante (ADAMS, 2010; EL BRIHI e PATHAK, 2024). As hemácias consistem principalmente em dois componentes: interior homogêneo preenchido com hemoglobina e exterior revestido pela membrana celular. Até um terço da hemácia é composta pela proteína hemoglobina, cuja a principal função é transportar oxigênio e dióxido de carbono, realizado devido a presença do íon de ferro embutido no estrutura heme. A membrana que envolve a hemácia a separa de outras células e conteúdos do ambiente, controlando toda comunicação entre seu interior e o exterior (BARBALATO e PILLARISSETTY, 2022; ATKINS, 2017).

Nos humanos, os principais distúrbios das hemácias incluem condições que afetam sua produção, seus constituintes ou sua função no transporte de oxigênio e dióxido de carbono. Inúmeras doenças podem afetar as hemácias, como a malária, anemia falciforme e tipos específicos de câncer, causando distintas alterações bioquímicas e estruturais (GIRI e TAMGADGE, 2024). Na literatura, as hemácias são reconhecidas como biomarcadores da gravidade de doenças, como as anemias hereditárias e adquiridas, bem como para outras patologias sistêmicas que não estão principalmente ligadas às

hemácias, como inflamação, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Autores destacam que existe a necessidade de maior compreensão das propriedades bioquímicas e estruturais das hemácias a fim de estabelecer relação com a gravidade das doenças sistêmicas (GURKAN, 2021; YADAV, DEEPIKA e KUMAR 2024).

Sendo assim, técnicas analíticas capazes de fornecer as características moleculares das hemácias são de grande importância para os estudos que investigam alterações em decorrência de doenças ou outras causas que afetam a função das hemácias. A espectroscopia Raman têm sido empregada em estudos com componentes sanguíneos desde o início da década de 1970 (ATKINS, 2017). Trata-se de uma técnica analítica capaz de fornecer informações sobre os modos vibracionais moleculares de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos, e outros componentes bioquímicos presentes no sangue (PEZZOTTI, 2021). Esta revisão apresenta a aplicação da espectroscopia Raman em estudos com hemácia humana, a fim de sintetizar informações acerca dos aspectos tecnológicos, bem como características espectrais Raman de hemácias saudáveis e alteradas em decorrência de doenças e outras causas, identificadas em estudos com diferentes propósitos de investigação.

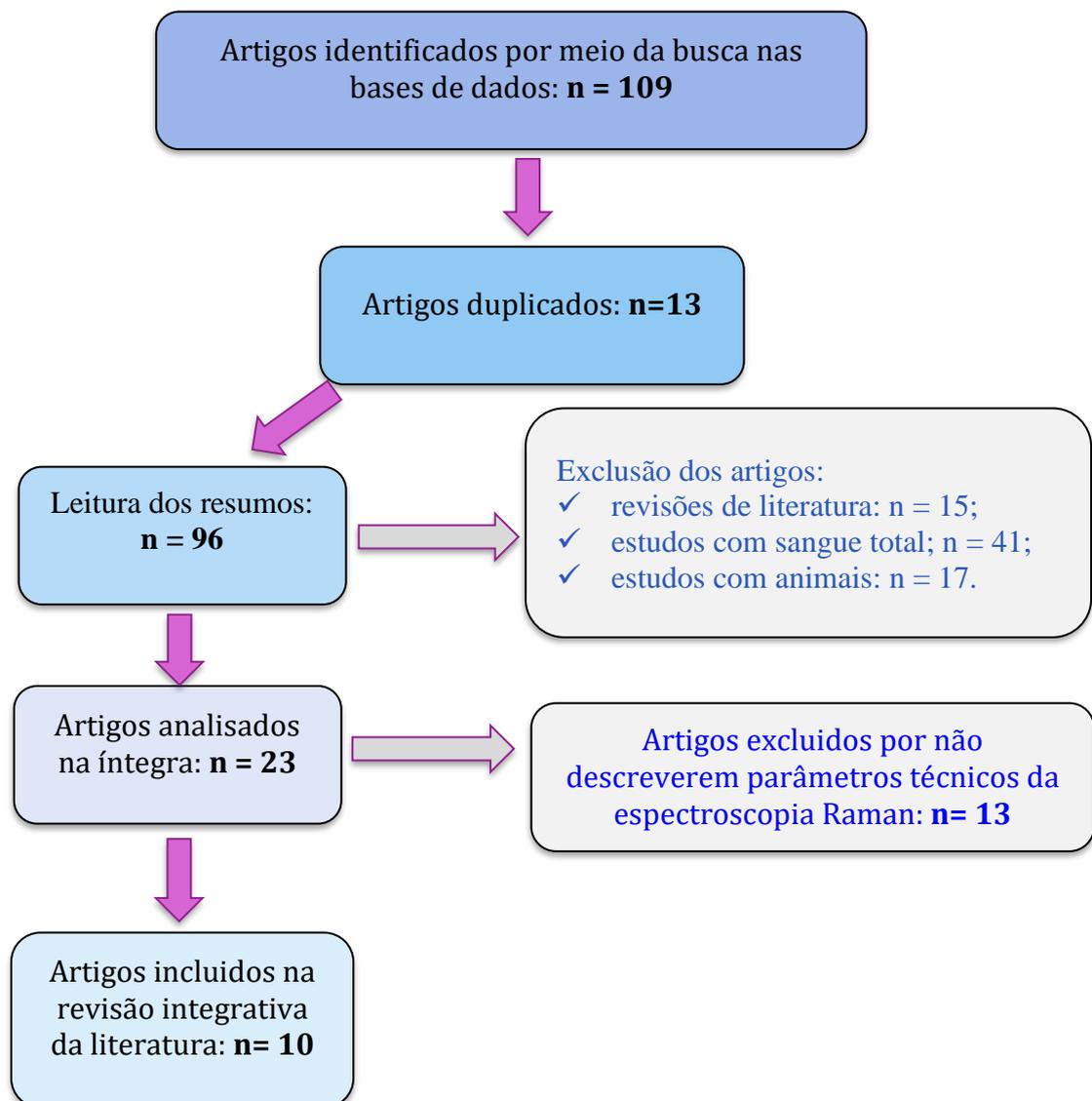
METODOLOGIA

Este estudo apresenta uma revisão integrativa da literatura, com objetivo de reunir informações acerca da temática de interesse, partir da literatura científica. Esta modalidade de revisão possibilita integrar os resultados de pesquisas e descrever o conhecimento no seu estado atual, proporcionando aos pesquisadores dados relevantes de um determinado assunto, em diferentes lugares e momentos, mantendo-os atualizados e facilitando aplicações de métodos investigativos em pesquisas (PARÉ et al., 2015; CASARIN et al., 2020).

Para o presente estudo foi realizado levantamento da literatura nas bases de dados PubMed, LILACS, Scielo e Cochrane, utilizando descritores combinados: “hemácia”, “espectroscopia Raman” e “hemoglobina”, e correspondentes em inglês: “red blood cells”, “Raman spectroscopy” e “hemoglobin”. Para a seleção dos artigos foi aplicado filtro avançado para busca por artigos originais nos idiomas Português e Inglês, publicados nos últimos dez anos, com texto disponíveis na íntegra. Após identificação dos artigos, foi realizada a leitura dos resumos e excluídos todos os artigos duplicados, revisões de literatura, estudos que utilizaram amostras de sangue total, estudos com hemácias de animais e aqueles que não descreveram os parâmetros técnicos da

espectroscopia Raman. Os artigos pré-selecionados foram lidos na íntegra a fim de análise detalhada do material. Por se tratar de uma temática específica com número reduzido de publicações disponíveis, artigos científicos anteriores ao ano 2014 foram citados apenas quando essenciais para o avanço da discussão de determinados pontos específicos. A figura 1 ilustra as etapas realizadas na presente revisão integrativa da literatura a fim de sistematizar a busca pelas informações.

Figura 1 - Etapas realizadas para a revisão integrativa da literatura



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

RESULTADOS

O levantamento inicial identificou 106 artigos. A partir desta pré-seleção, 13 artigos foram excluídos por apresentarem duplicação nas bases de dados, restando 96 artigos que tiveram seus resumos e metodologia (materiais e métodos) analisadas. Após análise, 73 artigos foram excluídos por se tratarem de revisões de literatura, análises com amostras de sangue completo ou estudos com animais. Os 23 artigos restantes foram lidos na íntegra, quando outros 13 artigos foram excluídos por não apresentarem detalhamento da técnica analítica utilizada no estudo. Portanto, finalmente 10 artigos foram selecionados e subsidiaram o desenvolvimento desta revisão de literatura.

O quadro 1 apresenta um resumo descritivo dos artigos incluídos para o desenvolvimento desta revisão, com autor(es), ano de publicação em ordem crescente, objetivo do estudo, tipo de amostra utilizada, descrição do comprimento de onda de excitação, potência do laser e tecnologia(s) acoplada(s) ao sistema Raman.

Quadro 1: Artigos publicados que foram incluídos no presente estudo, com aplicação da espectroscopia Raman no estudo de hemácias humanas.

Autor(es)	Ano de publicação	Objetivo do estudo	Amostra	Laser	Potência do laser	Tecnologia(s) acoplada(s) e/ou acrescidas ao sistema Raman
Lin et al. [1]	2014	Investigação da variação lipídica em membrana de hemácias de diabéticos tipo II	Membrana celular de hemácias obtida de concentrado livre de plasma e leucócitos	785 nm	1 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo
Oliveira et al. [2]	2014	Avaliar danos em hemáceas saudáveis aprisionadas (isoladas) com aplicação de diferentes potências do laser	hemácias em sangue diluído em DPBS (Dulbecco Phosphate-Buffered Salina)	785 nm	10 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica
Filho et al. [3]	2014	Avaliar diferenças espectrais Raman da hemoglobina S (anemia falciforme)	Hemoglobina obtida da hemólise de hemácias	830 nm	-	<i>Não se aplica</i>
Chen et al. [4]	2016	Avaliar hemácias infectadas por <i>Plasmodium falciparum</i> (malária)	Gotas de concentrado de hemácias secas em condições de ambiente ao ar livre	785 nm	30 mW	Microscópio óptico e técnica de espectroscopia Raman amplificada por superfície com nanopartículas (AgNRs)

Jia et al. [5]	2018	Caracterizar espectros Raman de hemácias de pacientes com talassemia beta	hemácias separadas do plasma por centrifugação em solução salina	780.24 nm	20mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica
Diniz et al. [6]	2019	Caracterizar o perfil eritrocitário de portadores de anemia falciforme	hemácias analisadas a partir de esfregaço de sangue preparados logo após coleta de sangue	532 nm	5% da potência do laser (26,6 mW)	Microscópio óptico com câmera de vídeo
Mithun et al. [7]	2020	Investigar o comportamento de hemácias em pacientes que receberam solução de hidroxietilamido (HES) para restauração de volume do plasma	hemácias diluídas em solução de plasma/HES	785 nm	7 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica
Lukose et al. [8]	2020	Investigar o impacto na tonicidade extracelular de hemácias no uso de fluido hipotônico e hipertônico intravenoso	Hemácias dispersas em fluido hipotônico e hipertônico intravenoso	785 nm	7 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica
Lenzi et al. [09]	2021	Analisar assinatura bioquímica do envelhecimento de hemácias saudáveis	hemácias analisadas por meio de esfregaço preparado com eritrócitos diluídos em plasma	532 nm	2 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo
Sanu et al. [10]	2022	Investigar espectros Raman em hemácias de pacientes infectados com dengue, malária e leptospirose	hemácias separadas do plasma e diluídas em solução salina tamponada com fosfato	785 nm	10 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica
Sanu et al. [11]	2024	Investigar hemácias de pacientes com icterícia	Suspensão de hemácias em Solução salina tamponada com fosfato	785 nm	10 mW	Microscópio óptico com câmera de vídeo e sistema de pinça ótica

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

A tabela 1 apresenta as principais bandas Raman identificadas pelos autores em hemácias saudáveis, cujos os resultados foram usualmente utilizados como padrão de comparação com as bandas identificadas em hemácias alteradas em decorrência de doenças e outras causas. O estudo de Lin et al. (2014), investigou somente a membrana celular de hemácias, isoladamente, cuja predominância de bandas Raman foram atribuídas aos componentes lipídicos e proteicos.

Tabela 1 - Principais bandas Raman de hemácias saudáveis ou componentes da hemácia (membrana celular e hemoglobina) de acordo com os estudos incluídos no presente estudo.

Bandas Raman (cm ⁻¹)		Assinatura molecular	Autores
Laser (nm) 512 ~532	Laser (nm) 780 ~785		
-	565	v(Fe-O2)	[4, 7]
747	747 ~754	v(modos de respiração pirrólica), triptofano	[5, 7, 8, 9, 11]
-	788	v(modos de respiração pirrólica)	[10, 11]
-	975	Glutationa	[10, 11]
1.000	999 ~1.003	Fenilalanina	[1, 2, 7, 9]
1.080	-	Modo flexão C-C (lipídio)	[9]
1.127 ~1.130	1.127	v(C-metil) ácido graxo saturado, L-valina	[5, 9]
-	1.222 ~1.223	C-H (metina)	[5, 7, 8, 11]
1.244 ~1.247	1.244 ~1.247	Amida III (colágeno)	[2, 4, 9]
1.258	1.258	Amida III (colágeno)	[6, 9]
-	1.264 ~1.265	Amida III (colágeno)	[1]
-	1.296	δ(CH ₂) ácido graxo saturado	[1]
1.373	1.373	vs(pirrólico), glutaciona	[3, 4, 6, 9]
-	1.389	Vibração grupo pirrólico	[10]
-	1.524	Vibração grupo pirrólico	[10, 11]
-	1.544 ~1.546	Modo de flexão CH ₂ e C-C (amido II)	[2, 5, 6, 7]
-	1.547	Modo de vibração do ácido glutâmico	[3]
-	1.554	Modo de vibração triptofano	[4]
-	1.561 - 1.565	v(C _β - C _β) Hemoglobina	[5, 6]
1.585	1.585	va(C _α - C _m), Fenilalanina	[4]
-	1.599	Estiramento C=O (Amida I)	[4]
-	1.602 ~1.603	Modo flexão C=C (fenilalanina/tirosina)	[6]
-	1.617 ~1.621	v(C=C), Fenilalanina	[3, 6, 7]
-	1.636 ~1.639	va(C=C)	[5, 7]
-	1.640	Amida I	[10, 11]
-	1.656	Amide I, v(C=O), v(C=N) + δ(NH ₂)	[1]
-	2.850	vs(CH ₂)	[1]
-	2.885	va(CH ₂)	[1]
-	2.935	vs(CH ₃)	[1]

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Legenda: v = Estiramento; δ = Deformação angular; vs Estiramento simétrico; va Estiramento antissimétrico.

As tabelas 2 e 3 apresentam as principais características espectrais das bandas Raman identificadas pelos autores em hemáceas alteradas em decorrência de doenças ou outras causas.

Tabela 2 - Características espectrais Raman de hemácias alteradas em decorrência de doenças de acordo com os estudos incluídos no presente estudo.

Bandas Raman (cm ⁻¹)	Diabetes (membrana das hemácias)	Anemia falciforme	Talassemia beta	Malária	Dengue	Leptospiros	Icterícia	Autores
565	-	-	-	↓	↓	↓	-	[10]
663	-	-	-	nova	nova	nova	-	[10]
723	-	-	-	↑	-	-	-	[3]
748 ~ 752	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	[4, 10, 11]
788	-	-	-	↓	↓	-	↓	[10, 11]
840	-	-	-	↑	-	-	-	[4]
882	-	↑	-	-	-	-	-	[3]
890 ~ 945	-	-	↑	-	-	-	-	[5]
951	-	-	-	↑	-	-	-	[5]
975	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[4, 9, 10, 11]
999 ~1.003	-	-	-	↑	↑	↑	↓	[1, 2, 10, 11]
1.025	-	-	-	↓	↓	-	↓	[10, 11]
1.049	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[10, 11]
1.080 ~1.087	-	-	-	↓	↓	↓	↓	[3, 10, 11]
1.123 ~1.127	-	-	-	↑	↑	-	↑	[2, 11]
1.165~1.175	-	-	-	-	↑	↑	↑	[10, 11]
1.212~1.213	-	-	↓	↑	↑	↑	↑	[2, 5, 10, 11]
1.222 ~1.124	-	-	-	↓	↓	↓	↓	[10, 11]
1.230 ~1.240	-	-	↑	-	-	-	-	[5]
1.246 ~1.248	-	-	↑	↑	↑	-	↑	[5, 11]
1.258	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[10, 11]
1.264 ~1.265	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	[5, 10, 11]
1.296	-	-	↑	-	-	-	-	[5]
1.368 ~1.370	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[11]
1.373	-	↑	-	↑	-	-	-	[3, 4]
1.375	-	-	-	-	-	-	↑	[11]
1.389	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[10, 11]
1.445 ~1.448	↓	-	↓	-	-	-	-	[1, 5]
1.460	-	-	-	↑	↑	↑	↑	[10, 11]
1.524	-	-	-	↓	↓	↓	↓	[10, 11]
1.544 ~1.546	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	[2, 5, 10, 11]

1.554	-	-	-	↑	-	-	-	[4]
1.561 ~1.563	-	-	-	↓	↓	↓	↓	[10, 11]
1.547	-	↓	-	-	-	-	-	[3]
1.599	-	-	-	↑	-	-	-	[4]
1.602 ~1.603	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	[5, 10, 11]
1.622	-	↓	-	-	-	-	-	[3]
1.617 ~1.619	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	[5, 10, 11]
1.636	-	-	-	↓	↓	↓	↓	[10, 11]
1.656	↓	-	-	-	-	-	-	[1]
1.771	-	-	-	-	-	-	↑	[11]
2.850 ~2.873	↑	-	-	-	-	-	-	[1]
2.935 ~2.965	↑	-	-	-	-	-	-	[1]

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Notas e símbolos: - = banda Raman característica de hemácia saudável; ↑ = intensidade aumentada; ↓ = intensidade diminuída; nova = nova banda Raman formada em decorrência da doença ou outras causas.

Tabela 3 - Características espectrais Raman de hemácias alteradas em decorrência de outras causas (não doença), de acordo com os estudos incluídos no presente estudo.

Bandas Raman (cm ⁻¹)	Envelhecimento da hemácia	Tonicidade extracelular no uso de fluido hipotônico	Tonicidade extracelular no uso de fluido hipertônico	Comportamento em hidroxietilamido	Autores
565	-	↓	↓	↓	[7, 8, 9]
674	-	↓	-	↓	[8, 9]
752	-	↓	-	↓	[7, 8]
972	-	-	↑	-	[7]
999	-	↓	-	↓	[7, 8]
1.085	↓	-	-	-	[9]
1.122	-	↓	↓	-	[7, 8]
1.130	↓	-	-	-	[9]
1.209	-	↓	-	↓	[7, 8]
1.222	-	↓	-	↓	[7, 8]
1.244	-	-	↑	-	[7]
1.302	-	-	↓	-	[7]
1.358	↓	-	-	-	[9]
1.368	-	-	↑	↓	[7, 8]
1.370	↓	-	-	-	[9]
1.372	←	-	-	-	[9]
1.384	-	-	↑	-	[7]
1.585	-	-	-	-	[9]

1.606	nova	-	-	-	[9]
1.638	↓	-	-	-	[9]

Fonte: Autores, 2024.

Notas e símbolos: - = banda Raman sem alteração; → = deslocamento da banda para frequências mais altas; ← = deslocamento da banda para frequências mais baixas; ↑ = intensidade aumentada; ↓ = intensidade diminuída; nova = nova banda Raman formada em decorrência da doença ou outras causas; não altera = banda Raman permanece igual ao espectro da hemácia saudável.

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados no quadro 1, é possível verificar aplicações da espectroscopia Raman na análise de hemácias para diferentes propósitos de estudo. Evidentemente, o interesse e a necessidade dos pesquisadores determinam o(s) componente(s) da hemácia a ser(em) investigados. Dybas et al. (2022) ressaltam que a depender do propósito, e dos resultados esperados pela pesquisa, é determinante a escolha de técnica(s) experimental(is) adequada(s). Destacam ainda que até o momento nenhuma técnica de investigação disponível fornece informações completas da morfologia e funcionalidade das hemácias, ao mesmo tempo. Entende-se que cada técnica atualmente disponível para estudo das hemácias apresenta aspectos prós e contras, que devem ser considerados no planejamento da metodologia de análise. Considerando que a hemácia madura é composta de membrana celular lipoproteica e citoplasma preenchido por hemoglobina, cabe aos pesquisadores optar por estratégias que proporcionem amostra de hemácia íntegra e/ou de seus componentes, isoladamente (ATIKS et al., 2017).

Referente aos aspectos tecnológicos da espectroscopia Raman aplicada em estudos com hemácias, verificou-se que na maioria dos estudos foi utilizado a excitação do laser em 785 nm e baixa potência entre 1 e 30 mW. Popp e Schie (2019) ressaltam que os comprimentos de onda do laser mais comuns para espectroscopia Raman de células eucarióticas são de 532 nm e 785 nm. No entanto, destacam que o laser com comprimento de onda de 532 nm é mais propenso a excitar a fluorescência da amostra e causar danos intracelulares em células vivas. Também, no caso de amostras desidratadas, pode resultar na queima, mesmo utilizando potência moderada. Embora promova menor produção de sinal Raman, o laser com comprimento de onda em 785 nm é considerado pelos referidos autores a melhor escolha para análise de células biológicas, uma vez que minimiza a fluorescência e não causa degradação térmica ou fotoquímica.

Ainda, de acordo com Magnus, Gunnar e Håkan (2020), sistemas de espectroscopia Raman que utilizam lasers com comprimentos de onda mais curtos,

possibilita a obtenção mais forte do efeito Raman, com tempos de aquisição curtos. Isso pode resultar em uma alta relação sinal-ruído e fornecer excelente resolução espectral com menor consumo de energia. Oliveira et al. (2014) demonstrou que a potência e o tempo de interação mais prolongados de lasers pode ocasionar mudanças significativas e irreversíveis em hemácias. A energia depositada na hemácia durante a realização da espectroscopia Raman pode ocasionar esgotamento da membrana, desnaturação de proteínas e privação de oxigênio, entre outros efeitos (POPP e SCHIE, 2019). Essas informações reforçam que o emprego do laser com comprimento de onda de 785 nm proporciona a utilização de potências mais baixas no sistema Raman, que ajudam a proteger amostras sensíveis, como hemácias e seus componentes, contra queima ou ignição.

Sobre as tecnologias acopladas ao sistema Raman, a microscopia óptica foi utilizada na maioria dos estudos, sendo denominada micro-Raman. Trata-se de uma ferramenta analítica em nível de microescala, que proporciona avaliação de perfis lipídicos e proteicos em células. Segundo Gouadec e Colomban (2007), a espectroscopia micro-Raman é uma das principais técnicas que permite o estudo de misturas heterogêneas de sólidos orgânicos ou inorgânicos em escala nanométrica. Observou-se também o emprego da tecnologia de pinça óptica para estudo de hemácias, isoladamente. A pinça óptica pode ser considerada uma variação da espectroscopia micro-Raman, e é usada para analisar células isoladamente, ou partículas biológicas suspensas em um ambiente aquoso (NAVAS-MORENO e CHAN, 2018). Permite manipular células ou componentes ainda menores aproveitando o fato que a energia luminosa exerce força sobre um objeto na qual incide (BHUMIKA e SAURABH, 2024).

Também, cabe destacar a espectroscopia Raman amplificada por superfície, ou espalhamento Raman aprimorado por superfície (SERS), tecnologia aplicada, por exemplo, no estudo de Chen et al. (20219), que empregou nanopartículas de prata para avaliar hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* (malária). Trata-se de um método que utiliza superfícies metálicas nanoestruturadas ou ásperas, cuja excitação a laser aciona as cargas elétricas superficiais criando um campo elétrico aprimorado. É útil para amplificar sinais Raman fracos, proporcionando aumento na contagem estatística de fótons espalhados disponíveis para detecção do sinal Raman (DING et al., 2014).

Sobre as características espectrais Raman, cabe destacar que a análise de hemácias íntegras proporciona a identificação de moléculas com base em espectros característicos únicos (ATKINS et al., 2017). sendo assim, alterações no sistema molecular podem

ocasionar mudança(s) de níveis de energia vibracional da molécula, uma vez que o espectro de espalhamento Raman de uma célula depende fortemente de sua rede metabólica. Nos estudos incluídos na presente revisão de literatura, verifica-se que o espectro Raman de hemácias saudáveis foi usualmente utilizada como referência nos diferentes estudos que investigaram alterações das hemácias em decorrência de doenças e outras causas.

Considerando que a hemoglobina corresponde a cerca de 95% do peso das hemácias, espera-se predominância de bandas Raman atribuídas aos componentes moleculares da proteína hemoglobina e das suas subunidades heme, que são altamente conjugadas, sendo um forte dispersor do sinal Raman (ATKINS et al., 2017). Sendo assim, os espectros Raman das hemácias íntegras apresentam predominância de bandas características da hemoglobina (assinaturas), conforme apresentado na tabela 1. Isto posto, entende-se que alterações biomoleculares das hemácias em decorrência de doenças e outras causas, provoquem mudanças espectrais observadas em regiões específicas, sugerindo mudanças bioquímicas e biofísicas nos componentes moleculares das hemácias, conforme apresentada nas tabelas 2 e 3. Por exemplo, Lin et al. (2014) destacaram que na diabetes tipo II, a membrana das hemácias apresentaram diminuição na quantidade de ácido graxo insaturado (redução da intensidade das bandas 1.445 e 1.656 cm^{-1}), devido a oxidação em decorrência da abundância de radicais livres no sangue hiperglicêmico. Também, identificaram aumento na intensidade das bandas relativas ao colesterol (2.873 , 2.935 e 2.965 cm^{-1}), e associaram tais achados ao aumento de algumas biomoléculas específicas na membrana celular das hemácias de diabéticos, concluindo que o aumento do teor de colesterol é uma característica importante para diabetes II.

Filho et al. (2014) e Diniz et al. (2019), utilizaram a espectroscopia Raman para discriminar a presença de hemoglobina mutante (HbS) em amostras de hemácias de pessoas com doença falciforme. Estes autores identificaram que as bandas 882 e 1.373 cm^{-1} apresentam maior intensidade nos espectros dos portadores da doença, e são atribuídos a valina. Já as bandas em 1.547 e 1.622 cm^{-1} atribuídas ao ácido glutâmico apresentam considerável diminuição nas intensidades. Estes resultados correspondem a condição hereditária da doença, onde ocorre a substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia beta da globina. Esta alteração genética leva a formação da hemoglobina S (HbS) e consequente polimerização da hemoglobina e falcização das hemácias.

Outros estudos demonstram mudanças nas características espectrais das hemácias na ocorrência de doenças infecciosas, como identificado por Sanu et al. (2022) e Chen et

al. (2016), com diminuição nas intensidades das bandas 565, 752, 999, 1.080, 1.222, 1.524, 1.544, 1.561, 1.602, 1.617, e 1.636 cm^{-1} , e aumento de intensidade nas bandas 975, 999, 1.049, 1.212, 1.246, 1.258, 1.264, 1.389 e 1.460 cm^{-1} , quando comparado ao espectro de hemácias saudáveis. Tais modificações espectrais ocorrem devido a presença/ação do agente infeccioso que modifica a membrana plasmática e o interior da célula hospedeira, aumentando a proporção de fosfolipídio/colesterol, e exportando um grande número de proteínas (CHEN et al., 2016). Já Mithun et al. (2020) e Lukose et al. (2020) investigaram modificações bioquímicas em hemácias após interação com substâncias externas (fluido intravenoso), sugerindo ocorrência de desoxigenação, uma vez que a espectroscopia Raman apresentou a banda em 564 cm^{-1} , característica do modo estiramento da ligação Fe-O₂ apresentou importante redução na intensidade.

Sobre o envelhecimento das hemácias, trata-se de um processo fisiológico fundamental que garante a homeostase sanguínea adequada, equilibrando a produção de novas hemácias pelo organismo, ao mesmo tempo removendo hemácias envelhecidas. Lenzi et al. (2021) utilizaram espectroscopia Raman para demonstrar as modificações bioquímicas em hemácias ao longo do tempo, identificando deslocamento da banda Raman em 1.372 cm^{-1} característica de hemácias completamente oxigenada para a banda 1.358 cm^{-1} característica de hemácias completamente desoxigenada. Esses autores também observaram a diminuição na razão de intensidade de pico das bandas 1.085/1.130 cm^{-1} , e relacionaram o resultado com modificações na fluidez e aumento da rigidez da membrana celular de hemácias mais antigas, assim como identificaram nas hemácias mais velhas uma nova banda em 1.606 cm^{-1} , concordando com Wood, Tait e McNaughton (2001) que atribuíram o surgimento da referida banda no espectro Raman de hemácias desoxigenadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão de literatura não intencionou discutir de forma pormenorizada todos os aspectos tecnológicos e características espectrais Raman identificadas nos diferentes estudos incluídos na presente revisão de literatura. No entanto, reuniu-se informações que demonstram a versatilidade da espectroscopia Raman, com amplo emprego nas investigações que requerem evidências em nível molecular das hemácias. A espectroscopia Raman, auxiliada por diferentes tecnologias acopladas ao sistema Raman, permite maior compreensão da hemoglobina, membrana celular e demais componentes das hemácias, sob diferentes condições, possibilitando a identificação das características

espectrais moleculares de hemácias saudáveis e hemácias alteradas em decorrência de doenças e outras causas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio dos grupos de pesquisas GETCRAD (IFBA) e GPAR (IFSC), e dos laboratórios de Caracterização de Materiais (LCM) e de Física Radiológica (LAFIR) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia.

REFERÊNCIAS

- Adams, J. Eukaryotic cells possess a nucleus and membrane-bound organelles, in *Essentials of Cell Biology*, 2005. ed. R. Becker. Cambridge, MA: NPG Education.
- Atkins, C. G., et al. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Applied spectroscopy*, 2017;71(5),767–793. <https://doi.org/10.1177/0003702816686593>
- Barbalato, L.; Pillarisetty, L. S. *Histology, Red Blood Cell*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539702/>
- Bhumika, R.; Saurabh, R. Optical Tweezers in Raman Spectroscopy. In book: *Raman Spectroscopy*, 2024. pag. 123-144. https://doi.org/10.1007/978-981-97-1703-3_6.
- Casarin, S. T., et al. Tipos de revisão de literatura: considerações das editoras do *Journal of Nursing and Health*. *Journal of Nursing and Health*, 2020;10(5), e20104031. <https://doi.org/10.15210/JONAH.V10I5.19924>
- Chen, F., et al. Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2015;12(6):1445–1451. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.03.001>
- Dean, L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), Chapter 4, Hemolytic Disease of the Newborn. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2266>
- Diniz, J.F., et al. Caracterização do perfil eritrocitário de portadores de anemia falciforme por espectroscopia Raman e microscopia de força atômica. *Anais: Encontro Anual da Biofísica UFPE*, 2019;54-58. Disponível em: <https://pdf.blucher.com.br/biophysicsproceedings/biof%20C3%ADsica2019/16.pdf>
- Ding, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): General Introduction. 2014. 10.1002/9780470027318.a9276. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470027318.a9276>
- Dybas, J., et al. Trends in biomedical analysis of red blood cells – Raman spectroscopy against other spectroscopic, microscopic and classical techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022; 146. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116481>.

El Brihi J., Pathak S. Normal and Abnormal Complete Blood Count With Differential. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604207/>

Filho, A. C., et al. Raman spectroscopy for a rapid diagnosis of sickle cell disease in human blood samples: a preliminary study. *Lasers in medical science*, 2015;30(1):247–253. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1635-z>

Giri, A.; Tamgadge, S. Red blood cells in health and disease. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*:10.4103/JMAU.JMAU_70_23, 2024. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_70_23

Gouadec, G.; Colombari, P. Raman Spectroscopy of nanomaterials: How spectra relate to disorder, particle size and mechanical properties, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2007; 53(1): 1-56. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2007.01.001>.

Gurkan, U. A. Biophysical and rheological biomarkers of red blood cell physiology and pathophysiology. *Current opinion in hematology*, 2021;28(3), 138–149. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000639>

Jia, W., et al. Raman characterizations of red blood cells with β -thalassemia using laser tweezers Raman spectroscopy. *Medicine*, 2018;97(39): e12611. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012611>

Lenzi, E., et al. Multivariate analysis of mean Raman spectra of erythrocytes for a fast analysis of the biochemical signature of ageing. *Talanta*, 2021;221, 121442. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121442>

Lin, J., et al. Erythrocyte membrane analysis for type II diabetes detection using Raman spectroscopy in high-wavenumber region. *Appl. Phys. Lett.* 10, 2014; 104(10): 104102. <https://doi.org/10.1063/1.4868390>

Lukose, J., et al. Red blood cells under varying extracellular tonicity conditions: an optical tweezers combined with micro-Raman study. *Biomedical physics & engineering express*, 2020;6(1): 015036. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ab6e1a>

Magnus, R.; Gunnar, E.; Håkan, K. Novel narrow linewidth 785 nm diode laser with enhanced spectral purity facilitates low-frequency Raman spectroscopy. *Proc. SPIE* 11252, *Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine*, 112521A. 2020. <https://doi.org/10.1117/12.2545875>

Mithun, N., et al. Human red blood cell behaviour in hydroxyethyl starch: probed by single cell spectroscopy. *RSC Adv.*, 2020; 10(52):31453-31462. <http://dx.doi.org/10.1039/D0RA05842D>",

Navas-Moreno, M.; Chan, J. W. Laser Tweezers Raman Microspectroscopy of Single Cells and Biological Particles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2018; 1745, 219–257. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5_13

Oliveira, M. A. S., et al. Microespectroscopia Raman para a avaliação de danos em hemácias aprisionadas por pinça óptica, In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Uberlândia, 2014.

Paré, G., et al. Synthesizing information systems knowledge: A typology of literature reviews, *Information & Management*, 2015; 52(2):183-199, <https://doi.org/10.1016/j.im.2014.08.008>

Pezzotti, G. Raman spectroscopy in cell biology and microbiology. *J Raman Spectrosc*, 2021;52(12), 2348. <https://doi.org/10.1002/jrs.6204>

Popp, J.; Schie, I. W. A Short Guide for Raman Spectroscopy of Eukaryotic Cells. *Spectroscopy Supplements*, 2019, 34(8):18–22. Disponível em: <https://www.spectroscopyonline.com/view/short-guide-raman-spectroscopy-eukaryotic-cells>

Sanu, J. S., et al. Micro-Raman spectroscopy study of optically trapped erythrocytes in malaria, dengue and leptospirosis infections. *Frontiers in medicine*, 2022; 9, 858776. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.858776>

Wood, B. R.; Tait, B.; McNaughton, D. Caracterização micro-Raman da transição do estado R para T da hemoglobina dentro de um único eritrócito vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Pesquisa de Células Moleculares*, 2021;1539(1-2):58–70. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00089-1)

Yadav, S.; Deepika, P.; Kumar, M. A Systematic Review of Red Blood Cells Biomarkers in Human Aging. *The Journals of Gerontology: Series A*, 2024; 79(4). <https://doi.org/10.1093/gerona/glae004>