

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Utilização de Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (NIRS)
para detecção e quantificação de efedrina em urina”**

Anderson Eduardo Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

São José dos Campos - SP

2004

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Utilização de Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (NIRS)
para detecção e quantificação de efedrina em urina”**

Anderson Eduardo Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco.

São José dos Campos – SP

2004

A padronização utilizada neste trabalho segue a Normalização de Dissertações e Teses da UniVap. <http://www.univap.b/Institutos/IPD/Normas-2004.pdf>

G 976u

Guimarães, Anderson Eduardo

Utilização de espectroscopia Raman no infravermelho próximo (NIRS) para detecção e quantificação de efedrina em urina./ Anderson Eduardo Guimarães. São José dos Campos: UniVap, 2004.

62p.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Raman, Espectroscopia 2. Efedrina 3. Doping no esporte I. Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Orient. II. Título

CDU: 796.011.5

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Aluno: *Anderson Eduardo Guimarães*

Data: *20 de dezembro de 2004*

**“UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO
(NIRS) PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EFEDRINA EM URINA”**

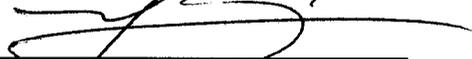
Anderson Eduardo Guimarães

Banca Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVERDE (UNIVAP)



Prof. Dr. MARCOS TADEU T. PACHECO (UNIVAP)



Prof. Dr. DANIEL AUGUSTO SILVA GENTIL (UNIFMU)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap
São José dos Campos, 21 de janeiro de 2005.

Dedico este trabalho aos alunos de graduação e pós-graduação e a todos os profissionais interessados nesta linha de pesquisa. Espero que este trabalho possa não somente esclarecer dúvidas, mas principalmente, ganhar a atenção daqueles com menor afinidade para a utilização de ferramentas matemáticas ou tecnológicas.

Independente do impacto deste estudo no meio acadêmico, espero que a minha passagem possa ser lembrada de forma positiva.

Espero ter colaborado com colegas de curso, com os alunos de graduação e com os funcionários, achando sempre algum tempo para o auxílio. Certamente, quando eu não mais estiver aqui (nesta instituição ou nessa existência) é apenas o que se lembrarem de mim que ficará.

Desejo que este trabalho esclareça as necessidades daqueles que o consultarem, pois este foi o meu objetivo.

Em primeiro lugar, agradeço à minha esposa Lidiane que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis desta etapa.

Agradeço ao Prof. Marcos Tadeu por acreditar na minha competência e esforço, garantindo condições para que este trabalho se realizasse e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Aos colegas Anderson da recepção e Anderson Lobo, secretárias Cláudia e Ivone, Prof. Johnny que garantiu o funcionamento do equipamento diversas vezes, Janaína pelo auxílio na experimentação animal, Prof. Airton pelo apoio, Prof. Landulfo pelos ensinamentos relativos ao instrumental, Prof. Egberto e Leandro pela ajuda constante, Prof. Maira, ao Prof. Lima e a bibliotecária Rosângela . Agradeço a todos, igualmente, pela cooperação e carinho.

Agradeço especialmente, a Prof. Juvalina da Feau pelo exemplo de atenção que deveria ser normal, mas que sabemos dificilmente é.

Ao Prof. Carlos Júlio, agradeço pelo exemplo de profissionalismo e dedicação durante a orientação de seus alunos, de graduação e pós graduação.

RESUMO

Atualmente, o controle de doping para uso de efedrina é realizado via coleta de urina e analisada em um cromatógrafo associado a um espectrômetro de massa. Este procedimento apresenta como principais desvantagens a necessidade de coleta de material, além de não apresentar um resultado de imediato. Este trabalho visa o desenvolvimento de uma técnica que permitirá não somente a avaliação da concentração da substância de modo não invasivo, como também permitirá se obter um diagnóstico em tempo real. Entretanto, nesta primeira etapa o objetivo foi demonstrar a aplicação da Espectroscopia Raman como uma nova alternativa, em igualdade de condições com o exame rotineiro. Foi utilizado um sistema Raman composto por um laser de Ti:Safira bombeado por um laser de Argônio. A radiação do laser de Ti:Safira foi sintonizada para o comprimento de onda de 785 nm e a potência obtida na amostra foi de 70mW. Foi analisada uma amostra de urina de rato Wistar que recebeu administração subcutânea de 0,5 ml de efedrina na concentração de 5mg/ml. O sinal foi coletado em um espectrômetro Kaiser f/1.8 e um detetor CCD refrigerado e, os espectros permitem identificar, a presença de Efedrina, através dos picos situados em 1002 e 1603 cm^{-1} , e o valor quantificado foi de 0,56mg/ml.

Palavras-Chave: Espectroscopia Raman, Doping, Efedrina, Laser, Diagnóstico não invasivo.

ABSTRACT

Actually, the doping control for ephedrine uses the urinalysis by the gas chromatography/mass spectrometry. This procedure presents as main disadvantages, the necessity of collecting material and the long time to obtain test results. This work aims to develop a technique that will allow to evaluate the concentration of the substance using a noninvasive tool, as well as a diagnosis in real time. Nevertheless, at this first stage, the objective is to demonstrate the viability of the Raman Spectroscopy as a new alternative, that can be so efficient as the routine examination. A Raman system composed by a Ti:Saphira laser pumped for an Argon laser was used. The excitation wavelength was 785 nm and laser power at the sample position was 70 mW. An urine sample of Wistar rat was analyzed after subcutaneous administration of 0,5 ml of ephedrine at the concentration of 5mg/ml. The signal was collected by a Kaiser spectrometer f/1.8 and a cooled CCD detector. Shifts of the Raman peaks at 1002 and 1603 cm^{-1} were studied, looking for the identification of ephedrine. It was found that Raman Spectroscopy allows a clear identification of ephedrine when this is present at a concentration of 0,56mg/ml.

Key-Words : Raman Spectroscopy, Doping, Ephedrine, Laser, Noninvasive diagnosis.

Lista de Figuras

Figura 1	– Representação do comportamento ondulatório da luz	03
Figura 2	– Esquema representativo da trajetória de um feixe de luz interagindo com um obstáculo.....	03
Figura 3	– Intensidade do sinal de espalhamento, nas regiões <i>Stokes</i> e <i>anti-Stokes</i>	05
Figura 4	– Esquema representativo para diferenciar os tipos de espalhamento.....	06
Figura 5	– Representação esquemática do conjunto óptico para aquisição do sinal Raman.....	09
Figura 6	– Representação esquemática do instrumental de aquisição	10
Figura 7	– Diagrama esquemático do sistema Raman.....	23
Figura 8	– Espectro da substância indino, apresentado em sua forma original e após a calibração do eixo das frequências.....	25
Figura 9	– Espectros de fluorescência e Raman separados graficamente	26
Figura 10	– Espectro Raman da efedrina.....	28
Figura 11	– Espectro Raman da urina humana	29
Figura 12	– Espectro para a concentração de 75mg/l.....	30
Figura 13	– Espectro da efedrina subtraída do espectro padrão de urina.....	31
Figura 14	– Intensidade do pico Raman versus concentração de efedrina na urina humana.....	31
Figura 15	– Intensidade do pico Raman versus concentração de efedrina na urina, para as quatro menores concentrações.....	32
Figura 16	– Espectro da efedrina subtraída da solução com concentração de 4,8µg/ml.....	32
Figura 17	– Comparação entre o espectro Raman de urina humana e de urina de rato Winstar.....	33
Figura 18	– Espectro Raman de urina animal após a administração de efedrina.....	34
Figura 19	– Espectro da efedrina em urina de rato após administração subcutânea, subtraída do espectro de urina normal.....	35

Figura 20 – Espectro Raman da efedrina (A), Espectro Raman da urina (B) e composição espectral (C) na região de 950 a 1050 cm^{-1}	39
Figura 21 – Comparação entre processamento matemático e dados experimentais na região de 950 a 1050 cm^{-1}	39
Figura 22 – Espectro Raman da urina (A), Espectro Raman da efedrina (B) e composição espectral (C) na região de 1400 a 1800 cm^{-1}	40
Figura 23 – Comparação entre processamento matemático e dados experimentais na região de 1400 a 1800 cm^{-1}	40

Lista de Abreviaturas

ER: Espectroscopia Raman

NIR: Infravermelho Próximo

NIRS: Espectroscopia no Infravermelho Próximo

CCD: Charge-Coupled Device

IR: Infravermelho

NI: Não invasivo

COI: Comitê Olímpico Internacional

COB: Comitê Olímpico Brasileiro

λ : comprimento de onda

nm: nanômetros.

ml: mililitro.

mg/ml: miligramas por mililitro

µg/ml: microgramas por mililitro.

W: Watts

mW: miliWatts.

Sumário

1. Introdução.....	01
1.1 Espalhamento de luz.....	03
1.2 Espalhamento Raman.....	04
1.3 Descrição do processo de interação inelástico.....	05
1.4 Espectroscopia Raman.....	07
1.5 Instrumentação da espectroscopia Raman.	07
1.6 Aquisição do sinal.....	08
1.7 Utilização do laser na ER.....	10
1.8 Influência da fluorescência da espectroscopia Raman.....	11
1.9 Processamento dos espectros Raman.....	12
1.10 Efedrina.....	12
1.11 Doping Esportivo.....	14
1.12 Dificuldades e problemas de detecção de efedrina pelo método tradicional.....	16
1.13 Aplicações da espectroscopia Raman.....	18
2. Objetivos.....	20
3. Material e Métodos.....	21
3.1 Laser	21
3.2 Óptica.....	22
3.3 Célula.....	22
3.4 Sistema de aquisição.....	22
3.5 Filtro.....	22
3.6 Bancada óptica.....	22
3.7 Procedimento com urina humana.....	23
3.8 Procedimento com urina animal.....	23
3.9 Processamento dos espectros.....	24
3.10 Calibração em frequência.....	24
3.11 Subtração do fundo de fluorescência.....	26
3.12 Calibração em intensidade.....	26
3.13 Normalização.....	26

4. Resultados.....	28
4.1 Medidas com adição artificial de efedrina em urina humana.....	28
4.2 Medidas comparativas em experimentação animal.....	33
4.3 Medidas com a droga sendo administrada ao animal e coletada via urina.....	33
5. Discussão.....	36
5.1 Seleção do comprimento de onda de excitação.....	36
5.2 Sistema de captação do sinal Raman.....	37
5.3 Picos observados no espectro Raman da urina.....	37
5.4 Picos observados no espectro Raman da efedrina em urina humana.....	38
5.5 Curva de concentração <i>versus</i> intensidade de pico Raman.....	41
5.6 Limite de detecção.....	41
5.7 Resultados do experimento com animal.....	42
5.8 Trabalhos futuros.....	42
6. Conclusão.....	45
7. Referências Bibliográficas.....	46
8. Anexo I.....	58

1. Introdução

Um dos pontos de grande interesse da espectroscopia Raman (ER) é sua aplicação na análise transcutânea. Trata-se da análise de parâmetros biológicos através da pele, permitindo um diagnóstico não invasivo (NI), obtido pela interação da luz com o tecido biológico (BERGER; WANG; FELD, 1996; KHALIL, 1999; KUNST, 1995; PILOTTO et al., 2001; TARR; TARR, 1993).

Na área da educação física, tem-se especial interesse pela avaliação do esforço físico através da medida da concentração do lactato sanguíneo (ALLEN et al., 1985; COSTILL, 1976; FARRELL et al., 1979; FOXDAL et al., 1994; KINDERMANN; SIMON; KEUL, 1979; LEHMANN et al., 1983; MADER, 1991; NAGLE et al., 1970; RUNDELL, 1995; SJODIN; JACOBS, 1981). Uma alternativa proposta para este fim é a utilização da ER (PILOTTO et al., 2001), possibilitando medir as concentrações de ácido láctico de modo NI, uma vez que o método atual traz o inconveniente desconforto de submeter o atleta a constantes coletas de sangue (BARON et al., 2003; BISHOP, 2004).

Outra aplicação, também discutida para a ER, é o teste de glicemia em diabéticos que sofrem com as constantes monitorações a partir de amostras de sangue (BORCHERT; STORRIE-LOMBARDI; LAMBERT, 1999; CAMERON et al., 1999; HAZEN, 1995; HEISE et al., 1994; HEISE, 1996; JAGEMANN et al., 1995; KHALIL, 1999; KUNST, 1995; MALIN et al., 1999; MARBACH et al., 1999; ROBINSON et al., 1999; STEFFES, 1999; TARR; TARR, 1993).

O grande interesse pela análise NI, tem reunido diversas áreas a fim de que a ER venha a funcionar de forma rotineira, substituindo técnicas como a biópsia e outros procedimentos invasivos (SILVEIRA JR et al., 2003).

O procedimento ideal, esperado para o futuro, é que a avaliação seja direta, não invasiva e, que forneça o resultado em tempo real. Neste caso poderia haver situações - em uma prova olímpica, por exemplo - onde todos os participantes seriam avaliados antes mesmo de realizar a prova, confirmando sua qualificação ou desqualificação.

O esforço contínuo do Comitê Olímpico Internacional (COI) busca aprimorar os procedimentos e técnicas utilizados à medida em que novas formas de doping são descobertas. Entretanto, algumas ocorrências no histórico do doping esportivo, trazem dúvidas até então não respondidas, como o caso Florence Griffith Joyner. Enquanto esta atleta consagrava-se na Olimpíada de Seul, 1988, o atleta canadense, Ben Johnson, também com o corpo nitidamente diferenciado em relação aos outros competidores, é

flagrado nos 100 metros rasos. A grande repercussão gerada, principalmente por tratar-se da primeira quebra de tempo, abaixo de dez segundos, estigmatizou este atleta que, aos poucos desapareceu do meio competitivo. Por outro lado, é impressionante o fato de que a atleta americana ainda detenha os recordes Mundiais e Olímpicos para os 100 e 200 metros rasos, mas tenha morrido misteriosamente, com apenas 38 anos. (AQUINO NETO, 2001).

A técnica proposta, principalmente sob o aspecto da análise transcutânea, tem uma grande vantagem que é dispensar a coleta de qualquer espécie de material, eliminando o rigoroso procedimento que é utilizado para controle de fraude.

Desses pontos, pode-se aquilatar a vasta gama de possibilidades que surgem e com as quais este trabalho pode colaborar. Como vantagem imediata, a aplicação da técnica NIRS (abreviação de espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo, na língua inglesa: Near Infrared Raman Spectroscopy), permite o desenvolvimento de um sistema compacto, oferecendo o diagnóstico em tempo real (DOU et al., 1997).

Considerando a interdisciplinaridade deste tema, é importante esclarecer conceitos básicos, terminologias, a função dos equipamentos utilizados, ou ainda, princípios ópticos, como o conceito de espalhamento da luz pelo qual a técnica se fundamenta, antes de se abordar diretamente o assunto principal.

1.1 Espalhamento de luz

O termo comprimento de onda é a distância na qual a fase se repete em uma onda, usualmente designado pela letra grega lambda (λ). Numa onda sinusoidal, o comprimento de onda pode ser medido pela distância entre dois picos consecutivos do campo elétrico da onda (Figura 1).

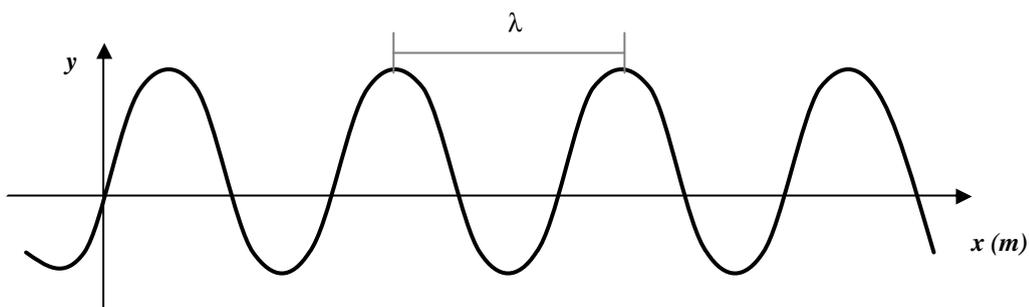


Figura 1 - Representação do comportamento ondulatório da luz. Onde o eixo x fornece a medida (em metros) de um padrão de comportamento (λ) que se repete periodicamente.

O fenômeno óptico de espalhamento da luz, ocorre quando um feixe de luz (onda eletromagnética) atinge um obstáculo e é disperso devido à colisão com partículas menores. Quando, estes feixes ou fótons, não alteram seu comprimento de onda durante estas colisões, tem-se o espalhamento elástico, ou também como é conhecido, espalhamento Rayleigh em reconhecimento aos estudos pioneiros deste pesquisador (BALL, 2001).

Na Figura 2, parte da luz incidente (i), é refletida (i_r) na superfície do obstáculo. Seguindo a diagramação exposta por Pacheco(1999), um raio de luz somente é dito refletido em uma superfície quando o ângulo do feixe incidente é exatamente igual ao ângulo do feixe que retorna.

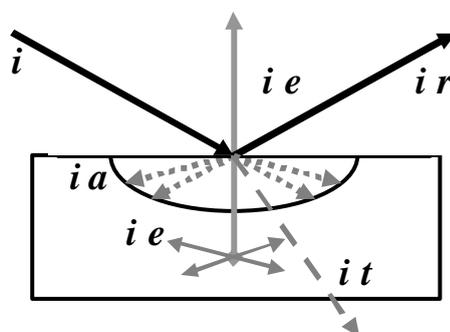


Figura 2 - Esquema representativo da trajetória de um feixe de luz interagindo com um obstáculo.

Durante a trajetória através do meio (Figura 2), parte do sinal incidente é absorvido (i_a) e outra fração consegue transpor o material, resultando no sinal transmitido (i_t). Durante este percurso, a colisão com partículas espalhadoras, desviará parte da luz, produzindo o espalhamento (i_e). O espalhamento é um mecanismo que reduz a quantidade de energia contida no feixe direto, e exprime o desvio de parte da energia luminosa guiada em várias direções. O coeficiente de espalhamento é definido como sendo o livre caminho médio que um fóton percorre antes de colidir novamente, sendo expresso em cm^{-1} (JACQUES, 1992; MCKENZIE, 1990).

Um espalhamento de interesse particular é o espalhamento Raman, no qual a onda espalhada apresenta um comprimento de onda diferente ao da onda incidente.

1.2 Espalhamento Raman

O primeiro passo para desvendar a origem da espectroscopia Raman ocorreu no primeiro quarto do século 20, através da descoberta do espalhamento da radiação monocromática com mudança de frequência que foi predito teoricamente pelo físico australiano A. Smekal (SMEKAL, 1923).

O fenômeno de espalhamento tinha sido estudado vastamente, durante muito tempo por muitos investigadores, entre os quais destacam-se Rayleigh em 1871, e Einstein em 1910. Entretanto, este tipo de espalhamento inelástico, foi observado experimentalmente em 1928, por Raman e Krishnan (RAMAN, KRISHNAN, 1928) e quase simultaneamente por Landsberg e Mandelstam (LANDSBERG, MANDELSTAM, 1928). Dois anos mais tarde, Raman recebeu o prêmio de Nobel de física pela a descoberta que carrega seu nome desde então.

Como muitas outras áreas relacionadas à química analítica, o desenvolvimento da espectroscopia Raman, dependeu em sua maior parte da disponibilidade de ferramentas apropriadas, e os avanços significativos seguiram invariavelmente dependentes de novos ou melhores instrumentos.

1.3 Descrição do processo de interação inelástico

Para ocorrer o espalhamento Raman, é necessário que a radiação eletromagnética interaja com a matéria através de seu campo elétrico, levando-a até um estado virtual. Ao contrário do processo elástico descrito anteriormente, o físico Raman demonstrou que uma fração menor da luz espalhada apresentava alteração no comprimento de onda em relação ao fóton incidente. Esta situação foi verificada através do deslocamento de frequência, resultando em fótons de menor ou maior energia (Figura 3) (FARIA;SANTOS;GONÇALVES, 1997; LONG, 1977; SALA, 1996) .

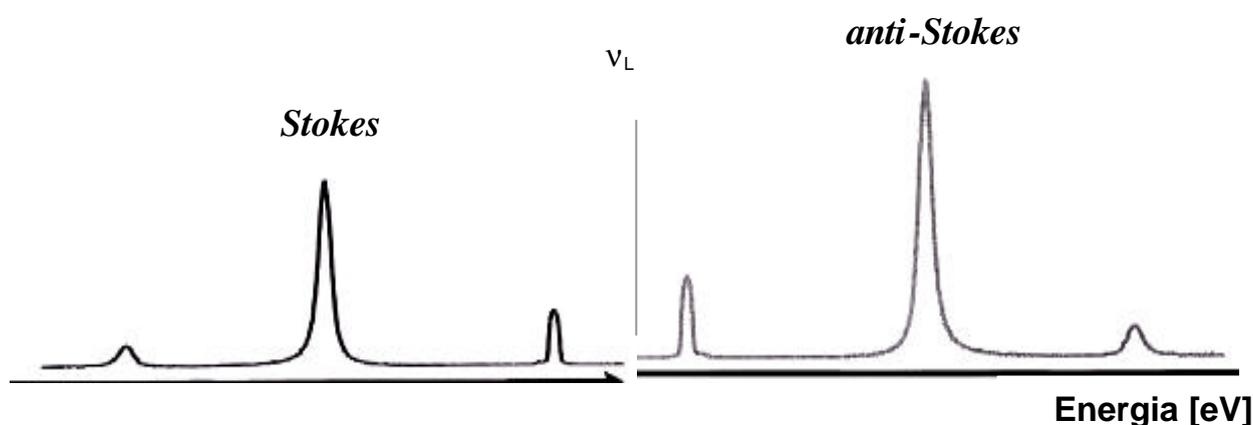


Figura 3 – Intensidade do sinal de espalhamento nas regiões *Stokes* e *anti-Stokes*.

Considere as moléculas em dois níveis vibracionais de energia: o estado fundamental e o estado excitado. O espalhamento Raman pode decorrer de 02 (dois) processos distintos, *stokes* e *anti-stokes*. Na região *stokes* (Figura 4 b), o fóton incidente colide com uma molécula em nível fundamental e a interação do fóton, faz a molécula ganhar energia atingindo o estado excitado. Para isso o fóton incidente cede energia, tornando-se um fóton espalhado de menor energia que o incidente (COTÉ, 2001; FARIA;SANTOS;GONÇALVES, 1997; LONG, 1977).

Na região *anti-stokes* (Figura 4 c), o fóton incidente interage com uma molécula vibracionalmente excitada, e devido a instabilidade do estado excitado, estimula a molécula a voltar para o estado fundamental, liberando energia. Como resultado, tem-se um fóton com maior energia (frequência mais elevada que o fóton incidente) - Este fóton é chamado de radiação *anti-stokes* (COTÉ, 2001; FARIA;SANTOS;GONÇALVES, 1997; LONG,1977).

A maioria dos estudos utiliza a região *stokes* de espalhamento inelástico, devido ao fato de haver uma maior probabilidade de encontrar em condições ambientais normais, um maior número de moléculas em estado vibracional fundamental. Portanto, a energia total coletada na região *stokes* será mais intensa (COTÉ, 2001; LONG,1977).

Pode-se concluir que em ambos os casos de processo inelástico, apresentados nas Figuras 4b e 4c, a diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado, corresponde exatamente a energia necessária para interagir nestes níveis vibracionais. Tal diferença de frequência está associada com as transições entre os níveis rotacionais, vibracionais e eletrônicos, em função da conformação molecular, da distribuição dos elétrons nas ligações químicas, e da estrutura molecular (SALA, 1996). A interpretação do espectro Raman permite determinar a composição química das moléculas, porque reúne os picos característicos das diversas emissões Raman da substância, como se fosse a “impressão digital” das moléculas (CAREY, 1982; CAREY, 1999; COTÉ, 2001; EDSALL, 1936; FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997).

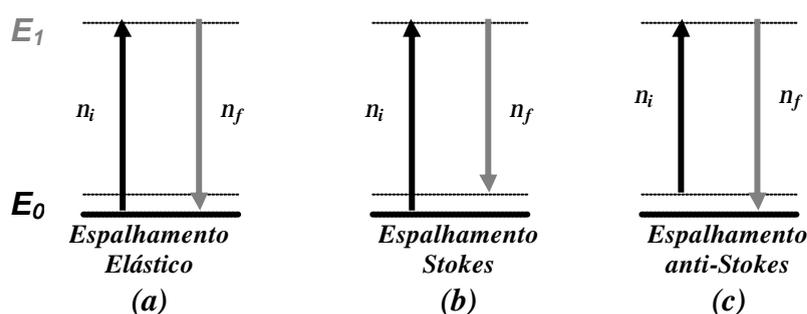


Figura 4 – Esquema representativo para diferenciar os tipos de espalhamento, sendo E_0 o estado fundamental, E_1 , o estado virtual excitado, e a frequência inicial do fóton incidente (n_i) e frequência final do fóton espalhado (n_f).

1.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia é o estudo do espectro obtido pela interação da radiação eletromagnética com a matéria. Sendo um dos seus principais objetivos, a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Esta técnica de análise, utiliza a radiação eletromagnética para testar o comportamento vibracional de moléculas, observando-se a absorção ou espalhamento dessa radiação (SALA,1996).

Segundo Coté(2001), a ER pode ser considerada como complementar à espectroscopia de absorção, porque nenhuma técnica sozinha pode resolver todos os estados da energia de uma molécula. De fato, para determinadas moléculas, alguns níveis de energia não podem ser resolvidos por uma ou outra técnica. Assim, a ER compreende a família das medidas feitas em meio molecular, com base no espalhamento inelástico da radiação eletromagnética monocromática por uma molécula ou grupo molecular.

A diferença entre a energia do fóton incidente e do fóton espalhado é determinada por uma mudança rotacional e vibracional da molécula. Esta mudança no estado de energia vibracional aparece no espectro Raman como um pico, ou banda, de emissão do fóton espalhado, com intensidade em unidades arbitrárias (eixo y). O conjunto de informações, relacionados aos deslocamentos de frequência (eixo x) é utilizado para identificar o grupo molecular responsável por tal espalhamento (COTÉ, 1997; COTÉ; CAMERON, 1997; FARIA, SANTOS, GONÇALVES, 1997, LASERNA, 2001; SALA, 1996).

Certamente, a espectroscopia Raman tem um significado especial no campo da química analítica, não somente por causa do próprio impacto da técnica, mas também porque seu desenvolvimento revolucionou os procedimentos até então utilizados, pela inserção de métodos físicos poderosos em uma disciplina que era puramente química (LASERNA, 2001).

1.5 Instrumentação na espectroscopia Raman

O desenvolvimento da ER ocorreu lentamente durante o período de 1930 a 1950, pois imediatamente após a sua descoberta, muitos trabalhos foram voltados apenas para estudos fundamentais. A introdução do laser foi um fator fundamental para o avanço da espectroscopia e, a utilização de computadores ocorreu relativamente tarde em comparação a outras técnicas. Como resultado, obteve-se o desenvolvimento comercial de

espectrômetros controlados por computadores, capazes de realizar aquisições rápidas com qualidade elevada (LASERNA, 2001).

O sucesso da aplicação da espectroscopia Raman para análise de processos biológicos é um resultado direto dos avanços na instrumentação Raman. A melhora obtida no desenvolvimento de filtros, detectores, espectrômetros, fontes e sistemas óticos, encurtaram o tempo de análise e melhoraram a relação sinal-ruído, sendo que os instrumentos de grande porte, estão sendo substituídos por sistemas menores e mais eficientes (DOU et al., 1997). Apenas com a melhora da técnica na aquisição dos sinais tornou-se possível distinguir tipos de tecidos e quantificar produtos químicos do sangue em tempo real. (COTÉ 1997).

Desta forma, a ER está começando a cumprir seu potencial de contribuir para a bioquímica estrutural, porque três principais fatores que impediram sua aplicação aos sistemas biológicos foram melhorados (KHALIL, 1999):

- a) baixa sensibilidade dos detectores;
- b) interferência do fundo de fluorescência;
- c) problemas com o tratamento e a interpretação dos dados.

1.6 Aquisição do sinal

Para resolver os problemas indicados no item anterior, foram implementados recursos óticos e melhorias tecnológicas, em função da baixa intensidade do sinal Raman. Como pode ser observado, (Figura 5) a interação luz-matéria produz fótons de espalhamento (**ER**) em todas as direções (360°), mas só é possível coletar aqueles que atingirem a abertura do espectrômetro (**S**).

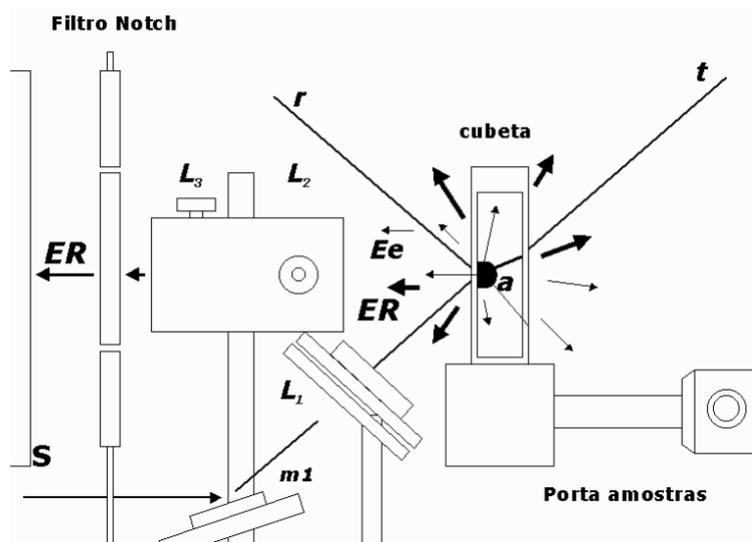


Figura 5 – Representação esquemática do conjunto óptico para aquisição do sinal Raman, onde: **Ee**: Espalhamento elástico; **L₁, L₂, L₃**: lentes; **m₁**: espelho; **r**: reflexão; **t**: transmissão; **a**: absorção.

O Charge-Coupled Device (CCD) foi inventado em 1970 por Boyle e Smith (BOYLE; SMITH, 1970) porém, seu uso como um detector para a espectroscopia Raman foi relatado apenas dezessete anos mais tarde (DIERKER et al., 1987). Este dispositivo eletrônico converte as intensidades de luz que incidem sobre ele em valores digitais armazenáveis.

O advento de filtros holográficos (filtro notch) aumentou a sensibilidade diversas ordens de magnitude (KIM, OWEN, CAREY, 1993). O uso conjunto com as câmeras CCD resultou no desenvolvimento de espectrômetros rápidos, permitindo a aquisição do espectro sobre uma larga faixa de comprimentos de onda, em tempo médio menor ou igual a 30 segundos (KHALIL, 1999).

Os filtros ópticos obstruem uma faixa espectral estreita, tal como a luz monocromática de um laser ao transmitir outros comprimentos de onda. São chamados também de filtros rejeita faixa ou rejeita banda e permitem obstruir mais de 99,9% da luz em uma largura de faixa de 15 a 40nm. (OWEN, 2002; TEDESCO et al., 1993).

A inclusão destes recursos contribuiu imensamente para a aquisição do sinal Raman, pois a baixa intensidade desta radiação exige realizar o experimento com a mínima quantidade possível de luz presente, tal como uma sala totalmente escura (FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997). Entretanto, ainda era observada uma grande contribuição do ruído térmico. Assim, para reduzir este problema, recorreu-se à refrigeração, diminuindo a interferência vibracional das moléculas do próprio equipamento, reduzindo o ruído térmico. O sistema Raman aperfeiçoou-se através da utilização de CCD com sistema de refrigeração a N₂, que é um dispositivo multi-canal,

com excepcional sensibilidade e ruído intrínseco muito baixo, melhorando a relação sinal-ruído e a velocidade de aquisição de dados. O sistema Raman do IP&D está ajustado para operar em -95°C , podendo atuar na faixa de $80^{\circ}\text{a} - 140^{\circ}\text{C}$.

A Figura 6 mostra a integração de equipamentos que realizam a aquisição do sinal Raman. O filtro holográfico que não aparece nesta representação (Figura 6) compõe este conjunto, sendo posicionado exatamente à frente da fenda do espectrômetro (item 4).

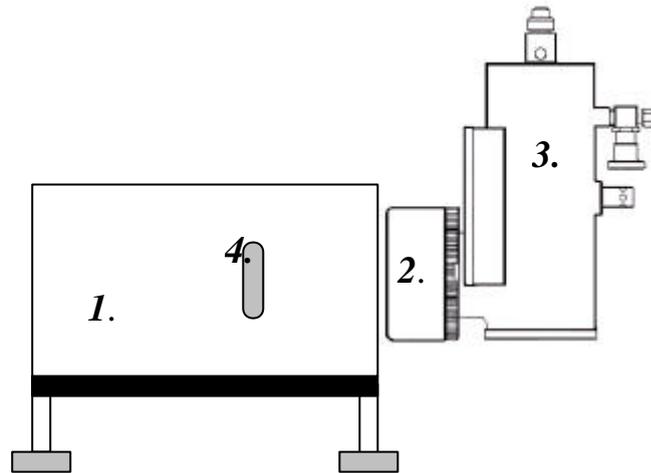


Figura 6 – Representação esquemática do instrumental de aquisição, onde: 1. Espectrômetro; 2. Detetor CCD; 3. Cilindro para refrigeração a N_2 ; 4. Fenda ou entrada do espectrômetro.

Somente com os avanços no instrumental e nos métodos de análise dos dados tornou-se possível medir o sinal Raman com um limite mais baixo da detecção comparável a outras técnicas de espectroscopia. (BELL; BARRON; HECH, 1994; BERGER; WANG; FELD, 1996; BERGER et. al, 1996; DOU; UENOYAMA, 1996; DOU et. al, 1996; ERKENS et. al, 1994; GOETZ et. al, 1995; KUNST, 1995; TANAKA et. al, 1996; TARR; TARR, 1993; WICKSTED et. al, 1995; XU et. al, 1997; YANG et al., 1993).

1.7 Utilização do laser na ER

Uma grande evolução na melhoria da qualidade dos espectros Raman, veio com invenção do laser em 1960 em função de sua característica monocromática (MAIMAN, 1960). O termo Laser é um acrônimo do termo em inglês “*Light Amplification by Stimulated of Radiation*”, ou seja, a amplificação da luz por emissão estimulada de radiação.

Inicialmente, os espectros Raman foram obtidos utilizando-se uma fonte não coerente, como a própria radiação solar (FARIA;SANTOS;GONÇALVES, 1997). Entretanto, são diversas as vantagens quando se utiliza um laser. Não somente tem-se a possibilidade de focalizar uma grande quantidade de energia em uma amostra muito pequena, permitindo assim espectros excelentes, como também pode-se ter grandes vantagens utilizando um feixe com largura de linha extremamente estreita e com possibilidade de variação do seu comprimento de onda central de excitação.

Quantidade de amostra da ordem de microgramas, passou a ser suficiente em comparação às quantidades utilizadas anteriormente, que eram superiores, em torno de 10⁴ a 10⁶ vezes (LASERNA, 2001). Passou-se também a se utilizar mais freqüentemente as janelas ópticas dos meios biológicos que estão definidas fundamentalmente pela água e hemoglobina, contidas nos organismos. Desta maneira, utiliza-se a faixa entre 600-1100 nm do espectro, obtendo-se a penetração mais profunda da radiação laser no tecido, o que permite uma medida espectral ou um procedimento terapêutico mais eficiente (CHEONG; PRAHL; WELCH, 1990; KHALIL, 1999; SAIDI; JACQUES; TITTEL, 1995; VAN GEMERT et al., 1989; WILSON; JACQUES, 1990).

A excitação na região NIR oferece também comprimentos de onda mais longos, que passam através das amostras de tecidos com absorção mais baixa e fluorescência reduzida em relação a outras regiões espectrais, tais como, o visível ou o ultravioleta. (KHALIL, 1999). Outro aspecto importante é o advento de detectores com elevada eficiência nesta região (DONG; DINAKARPANDIAN; CAREY, 1998).

1.8 Influência da fluorescência na espectroscopia Raman

A fluorescência que ocorre juntamente com o efeito Raman, é característica em tecidos altamente vascularizados, devido a elevada concentração de proteínas e de outros componentes fluorescentes, sobrepondo as informações espectrais de interesse (BERGER et al., 1996; GOETZ et al., 1995; KHALIL, 1999; LAMBERT; STORRIE-LOMBARDI; BORCHERT, 1998; TARR, 1991; WANG et al., 1993; WICKSTED et al., 1994). A excitação com comprimento de onda na região do NIR, foi proposta para amenizar este problema porque o componente de fluorescência cai com o aumento do comprimento de onda. Entretanto, além da fluorescência que diminui com o comprimento de onda, o sinal Raman também decai. Assim, há um limite entre a fluorescência minimizada e a necessidade de manter o sinal Raman (KHALIL, 1999).

A utilização de lasers sintonizáveis, permite deslocar o comprimento de onda de excitação para a região infravermelho próximo (região NIR), uma vez que o comprimento de onda de excitação é fundamental para melhorar a relação sinal Raman e fluorescência (BERGER et al., 1996; GOETZ et al., 1995; KHALIL, 1999; LAMBERT; STORRIE-LOMBARDI; BORCHERT, 1998; TARR, 1991; WANG et al., 1993; WICKSTED et al., 1994).

1.9 Processamento dos espectros Raman

Uma das maiores dificuldades na obtenção dos espectros Raman é a fluorescência do tecido biológico. A subtração computacional deste fundo de fluorescência foi facilitada com a disponibilidade de programas "amigáveis" e do poder computacional sempre crescente (KHALIL, 1999). O sistema Raman é gerenciado pelo programa Winview © que é fornecido pelo fabricante do equipamento. Além de possuir algumas funções específicas para o tratamento dos espectros, este programa permite exportar os dados em formato universal (arquivo texto), de modo que o processamento pode ser realizado em qualquer outro aplicativo, de preferência do usuário. Neste caso, poderão ser utilizados desde os programas mais simples, como a conhecida planilha Excel © da Microsoft, até as sofisticadas rotinas matemáticas em ambiente MatLab ©, que podem ser desenvolvidas para realizar operações específicas.

1.10 Efedrina

A efedra é uma planta bastante utilizada na medicina tradicional chinesa, que a conhece por volta de 2737 a.C., sendo considerada a mais antiga de todas as substâncias medicinais. Além da Efedrina (que representa cerca de 30-90% do total de alcalóides) e da pseudoefedrina, a efedra contém compostos químicos relacionados com o tanino (GOODMAN; GILMAN; 1996; MARTINDALE, 1977; PAGNANI; OLIVEIRA; SANTONJA, 2002).

A Efedrina é encontrada na forma de grânulos ou cristais brancos, que se decompõem na presença de luz, devendo ser armazenada em frascos opacos. É solúvel em água, álcool, clorofórmio e éter. Possui atividade α e β -agonista com capacidade de aumentar a liberação de noradrenalina dos neurônios simpáticos. É uma droga que estimula o aumento da frequência cardíaca e o débito cardíaco, e invariavelmente aumenta

a resistência periférica, podendo dessa forma, elevar a pressão arterial (GOODMAN; GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1977).

A ativação de receptores β -adrenérgicos (inclusive β_3) nos pulmões, promove broncodilatação e estimulação não seletiva do sistema nervoso simpático, gerando um aumento da termogênese (LIU et. al, 1995). É um potente estimulante do sistema nervoso central (SNC), sendo que após sua administração oral, seus efeitos podem persistir por várias horas (GOODMAN; GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1977).

É eliminada na urina em sua forma íntegra, tendo uma meia vida de aproximadamente 3 a 6 horas (GOODMAN; GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1977).

A efedrina, quimicamente, pertence ao grupo das fenilpropanolaminas. É um alcalóide, tendo como base um anel benzênico monosubstituído, ligado a uma cadeia carbonada, contendo um hidróxilo e uma amina secundária como principais grupos substituintes. Algumas modificações em sua estrutura, acarretam um aumento de sua ação periférica ao mesmo tempo em que reduzem a ação central sobre receptores adrenérgicos. Isso fez com que a efedrina demonstrasse potencial para tratamento da asma, e de fato, durante muitos anos, efedrina isoladamente ou a combinação de efedrina e teofilina, foram tratamentos de primeira escolha para essa doença. (LIU et. al, 1995)

A associação de efedrina com metilxantinas (como cafeína, teofilina e aminofilina) ou aspirina, promove um aumento da duração da atividade da noradrenalina. A atividade da noradrenalina é diminuída pela adenosina e pelas prostaglandinas, que por sua vez sofrem inibição pela cafeína e pela aspirina. A inibição da fosfodiesterase pela cafeína, parece ser o efeito mais importante, uma vez que essa enzima é responsável pela metabolização do AMP cíclico, e sua inibição aumenta ainda mais a atividade da noradrenalina (DULLOO, SEYDOUX; GIRARDIER, 1992; HALPERN; MANCINI, 1996).

O fato da efedrina ser uma das principais substâncias utilizadas no meio desportivo e a facilidade de acesso para esta substância que hoje está disponível em suplementos alimentares e remédios para emagrecimento, foram determinantes para sua escolha neste estudo (MANCINI; HALPERN, 2002; PASQUALI et. al, 1987; TSENG et. al, 2003).

1.11 Doping esportivo

Nos desportos, a busca por melhores resultados é uma constante preocupação e tem levado alguns atletas a utilização de recursos ilegais a fim de se obter vantagens sobre os adversários. As ações repugnadas pelas entidades dirigentes do desporto são classificadas como "doping", que é definido como:

“a utilização de substâncias ou métodos capazes de aumentar artificialmente o desempenho esportivo, sejam eles potencialmente prejudiciais à saúde do atleta ou a de seus adversários, ou contra o espírito do jogo” (DE ROSE et. al, 2004).

Quando qualquer destas condições está presente, caracteriza-se o doping, de acordo com o Código da Agência Mundial Antidoping. (DE ROSE et. al, 2004).

Entre as principais substâncias condenadas pelo COI, encontram-se a efedrina, eritropoietina (EPO), testosterona, stanozolol, nandrolona, furosemida e DHEA ativos (DE ROSE et. al, 2004; DIRIX; KNUTTGEN; TITELL, 1988; MOTTRAM, 1988; YESALIS; COWART, 1988)

Destas, uma classe de grande destaque é a das substâncias estimulantes, como a efedrina, a cafeína e similares, que visam diminuir a sensação de fadiga, proporcionando o aumento da performance de resistência. Geralmente, são utilizadas por praticantes de esportes coletivos, como basquete, vôlei e futebol, também servem para atletas de provas de longa duração, como a maratona e a marcha (DE ROSE et. al, 2004; GOLDING, 1972; JACOBS; PASTERNAK; BELL, 2003; LOMBARDO, 1986) .

Uma taxa elevada de incidência para o emprego de efedrina também foi detectada em fisiculturistas. É provável que a incidência elevada de violações do doping para substâncias relacionadas à efedrina, esteve associado ao emprego inadequado, devido à sua disponibilidade em medicamentos de fácil acesso (para tratamento de gripe e asma), em alguns suplementos alimentares para ganho de massa muscular e, em medicamentos para emagrecimento (GURLEY; GARDNER; HUBBARD, 2000; GREEN; CATLIN; STARCEVIC, 2001; MANCINI; HALPERN, 2002; PASQUALI et. al, 1987; TSENG et. al, 2003).

A análise da quantidade de efedra em 20 suplementos dietéticos à base de ervas encontrou muitas discrepâncias com relação ao conteúdo divulgado pelo fabricante. A metade dos produtos apresentou variação maior que 20% na quantidade descrita no rótulo e um produto não continha nenhum ingrediente ativo. Cinco produtos apresentaram quantidades significativas de nor-pseudo-efedrina, substância controlada pela Drug

Enforcement Agency - DEA (Órgão de Combate ao Narcotráfico) dos Estados Unidos. Os pesquisadores também encontraram uma variação significativa nos lotes dos mesmos fabricantes, indicando um controle de qualidade deficiente. Relataram também, que as indicações do rótulo não eram explícitas quanto à quantidade de efedra presente, que variou de 0 a 150 por cento da quantidade indicada na etiqueta (GURLEY; GARDNER; HUBBARD, 2000).

O teste de alguns suplementos alimentares, revelou a existência (não informada no rótulo do produto) de pequenas quantidades de substâncias como a nandrolona, testosterona, cafeína, efedrina e outras que podem resultar em teste antidoping positivo (GREEN; CATLIN; STARCEVIC, 2001).

A efedrina tem recebido recentemente grande atenção devido ao largo uso por atletas, ignorando seus potenciais efeitos colaterais. Algumas drogas de prescrição comum (como por exemplo, metilfenidato e bupropiona), levantam as considerações complexas a respeito de seu uso terapêutica apropriado no meio desportivo (BOHN; KHODAEI; SCHWENK, 2003).

Drogas estimulantes, algumas ilícitas (por exemplo, a cocaína), geralmente são usadas por atletas e causam uma escala larga de efeitos potencialmente ergogênicos. De modo geral, estas drogas são importantes devido ao uso freqüente, a freqüência com que são mencionadas nos meios, e seu potencial para causar efeitos adversos significativos (BOHN; KHODAEI; SCHWENK, 2003).

A efedrina é um princípio ativo comum para tratamento de faringite, resfriados entre outros distúrbios respiratórios e, por esse motivo, o COI divulga, anualmente, um relatório intitulado: “Informações sobre o uso de Medicamentos no Esporte” onde estão relacionados alguns medicamentos que contém codeína, efedrina e propanolamina (Bisolvon compositum). O objetivo é prevenir a ocorrência de exames positivos devido à utilização destes medicamentos e alertar quanto aos perigos potenciais, uma vez que somado ao efeito ergogênico, o uso crônico apresenta efeitos colaterais como hipertensão, taquicardia, paranóia psicótica e depressão (DIRIX; KNUTTGEN; TITELL, 1988; MOTTRAM, 1988; YESALIS; COWART, 1988).

Alcalóides de efedrina, como a efedrina, a pseudoefedrina, a fenilpropanolamina e a metilefedrina são encontrados comumente em medicamentos comerciais, sendo que alguns destes produtos já estão catalogados na lista de medicamentos proibidos pelo COI. De 91 medicamentos, analisados por um estudo, 80% apresentaram efedrina em sua

composição, sendo que a metilefedrina (52%) foi o princípio ativo mais comum (TSENG et. al, 2003).

Compostos de efedrina foram detectados nos testes de doping em urina durante as competições nacionais em Taiwan, no período de 1999 a 2001. 1803 amostras de urina de atletas foram analisados por cromatografia e espectrometria de massa. Do total de amostras, obteve-se aproximadamente 2,8% de positivos para estimulantes, sendo 28% para uso de efedrina (DE ROSE et al., 2004; IOC, 2003; TSENG et. al, 2003). Já nos Jogos Panamericanos de 2003, em Santo Domingo, 8 casos positivos para estimulantes foram detectados (DE ROSE et. al, 2004).

1.12 Dificuldades e problemas de detecção de efedrina pelo método tradicional

Atualmente, as amostras de urina são analisadas por duas técnicas associadas: a cromatografia e a espectrometria de massa (AQUINO NETO, 2001; HAWKS; CHIANG, 1986; HENDERSON et. al, 1996; IOC, 2003).

Existem algumas vantagens para a utilização da urina como material de análise. O principal motivo é que a urina contém moléculas representativas de todas as substâncias presentes no organismo, sejam elas endógenas ou exógenas, além de detectar a excreção de metabólitos com relativa vantagem frente a outras fontes como o sangue, a saliva, ou o cabelo. Em comparação ao sangue, a grande vantagem da urina é que a concentração de drogas e metabólitos, no sangue cai a níveis baixos num intervalo de algumas horas após o último uso, enquanto que na urina, existe um período de aproximadamente um a três dias para viabilizar a detecção (AQUINO NETO, 2001; HAWKS; CHIANG, 1986; HENDERSON et. al, 1996; IOC, 2003).

A análise de cabelo tem sido proposta por outros autores. Este processo utiliza a mesma tecnologia empregada no exame em urina oferecendo um período viável para análise, de cerca de 90 dias (HENDERSON et. al, 1996). Por outro lado, no cabelo a contaminação externa por drogas no ambiente (cosméticos químicos ou tabagismo passivo) é uma ocorrência provável. Neste sentido, falsos positivos precisam ser evitados com um grau elevado de certeza. Entretanto, o interior do cabelo ao contrário do pulmão e do trato gastrointestinal, é altamente resistente à penetração por drogas exógenas, permitindo a utilização desta via (BAUMGARTNER; HILL, 1992; BAUMGARTNER; HILL, 1993).

Como principais dificuldades no método atual estão: a segurança na coleta e no transporte do material; a manutenção e a retenção de amostras positivas para a possível contra-prova; e, o tempo de análise previsto em 24 horas. (DUPONT, 1990; DUPONT, 1991)

Outro aspecto relevante está na carência em instalações credenciadas. Somente em 2002, o Lab Dop-Ladetec/UFRJ (Laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro) foi certificado pelo COI (Comitê Olímpico Internacional) como o único laboratório da América Latina, credenciado para realizar exames antidoping em competições internacionais. O COI exige que o laboratório possua o credenciamento prévio pela norma ISO-17.025, que certifica os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, sendo que, existem apenas 28 laboratórios credenciados pelo COI, dentre os quais somente dois pertencem a instituições privadas.

“O sistema de controle deve contar ainda com uma equipe de coleta treinada para essa finalidade. Para garantir a qualidade da coleta e coibir fraudes, em geral essas equipes são formadas por médicos com especialização em medicina do esporte, farmacêuticos, bioquímicos, etc. A sofisticação das fraudes na coleta e transporte das amostras para o laboratório fez com que o COI desenvolvesse um sistema à prova de fraudes. A começar pela coleta, que é feita pelo atleta urinando na presença do observador responsável por ela, com corante azul na água do vaso sanitário. O próprio atleta transfere a urina para dois frascos (prova e contraprova), que são por ele selados com tampas dotadas de lacre que se rompe ao abrir. O material de coleta e os frascos são escolhidos pelo atleta dentre vários disponíveis. Cada par de frascos tem numeração única, com o frasco da prova sendo o “A” e o da contraprova sendo o “B”. Dependendo da sofisticação da Federação, selos podem ser adicionados aos frascos; os mesmos podem ser embalados em bolsas lacradas e estas ser acondicionadas em sacolas lacradas. Toda essa cadeia de identificação e lacres numerados é conferida quando a amostra é recebida no laboratório, ou aberta. O laboratório só identifica a amostra pelo seu número de código, não tendo nenhuma informação sobre a identidade do atleta. A chave para essa identificação fica retida em envelope lacrado e selado, guardado com o responsável pelo controle de dopagem junto à Federação solicitante. O número de código da Federação é lançado em caderno de registro do laboratório e, a partir daí, a amostra recebe um número de código do laboratório, com o qual passa por todos

os procedimentos necessários à caracterização dos analitos” (DE ROSE et. al, 2004).

1.13 Aplicações da espectroscopia Raman

Nas duas últimas décadas, autores como Berger; Itzkan; Feld (1997), Edwards et. al (1993); Goetz et. al (1995), Lambert; Storrie-Lombardi; Borchert (1998), Tarr (1991), Wang et al. (1993) e Wicksted et al. (1994) aplicaram métodos estatísticos para estimar as concentrações bioquímicas dos espectros Raman.

A técnica NIRS transformou-se em uma poderosa ferramenta para estudar uma variedade de moléculas biológicas, incluindo proteínas, enzimas e imunoglobulinas, ácidos nucleicos, nucleoproteínas, lipídeos, membranas biológicas, e os hidratos de carbono. Por causa de sua aplicabilidade aos problemas biológicos, especificamente à identificação bioquímica, esta técnica está sendo estudada agora como um recurso de monitoração não invasivo para análise qualitativa e quantitativa (CAREY, 1982).

Shaw et al. (1999), descrevem que há ainda uma necessidade contínua para métodos diagnósticos em tempo real (*on-line*), para a caracterização de processos biológicos, em cujas expectativas estão voltadas para a velocidade de processamento a possibilidade de acesso NI, não reagente, alta precisão diagnóstica e, ainda o baixo custo de implementação. Porém, com exceção da técnica NIRS, quase nenhum método foi definido.

O laboratório Raman do IP&D têm desenvolvido trabalhos com a técnica NIRS, dentre os quais destacam-se o estudo de Duarte et al. (2002), que realizou diferenciação de soro positivo e negativo para toxoplasmose pela caracterização de anticorpos IgG e IgM em gatos domésticos através da espectroscopia Raman, associada à análise estatística multivariada; e o trabalho de Pilotto et al. (2001) que defendeu uma nova técnica de diagnóstico transcutâneo para componentes sanguíneos.

Durante os últimos anos, houve um grande interesse pela instrumentação Raman como método apropriado para a análise de sistemas biológicos, graças ao desenvolvimento de detectores mais sensíveis - CCD. Aliando-se a isto o desenvolvimento de programas e filtros notch, abriu-se uma nova alternativa para resolver o problema da fluorescência de fundo típico em amostras biológicas (ADAR; GEIGER; NOONAN, 1997; HIRSCHFELD; CHASE, 1986).

Estes e outros avanços técnicos fazem a espectroscopia Raman ser definida como uma ferramenta muito promissora para a análise rápida, não-invasiva, de multiparâmetros em sistemas biológicos. Tem-se considerado, por muito tempo, a potencialidade de aplicação da ER para análise quantitativa de vários compostos. A espectroscopia Raman caminha para no futuro próximo se tornar uma prática rotineira como uma técnica quantitativa universal, (DOU et al. 1997; LOMBARDI et al., 1994; VICKERS; MANN, 1991).

Considerando as imensas vantagens que se destacam com esta técnica, este trabalho propõe a utilização da técnica NIRS como uma ferramenta alternativa para o controle de doping, sendo que, nesse primeiro momento o interesse foi demonstrar esta aplicabilidade em análises qualitativa e quantitativa de efedrina em urina.

Como a efedrina é eliminada na urina em sua forma íntegra, (GOODMAN; GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1977), a análise *in vitro* adicionando-se a substância de estudo diretamente na urina humana, permitiu avaliar as possibilidades práticas, evitando a utilização inadequada de animais. Assim, analisando a interação das informações espectrais da droga e da urina foi possível verificar as regiões espectrais mais apropriadas para a avaliação da amostra.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho, visa avaliar a detecção qualitativa e quantitativa de efedrina em urina.

3. Material e Métodos

Em termos instrumentais, avaliou-se o sistema Raman existente no laboratório Raman do IP&D/UniVap, determinando a resolução para identificar os picos mais importantes da substância estudada. Para isto, foram planejadas as seguintes etapas:

(a) Avaliação da diferença espectral entre os picos da urina animal e humana e da substância estudada para se verificar a capacidade instrumental de resolvê-las.

(b) Comparação e subtração dos espectros, no sentido de comprovar a existência da substância quando misturada com a urina animal ou humana.

(c) Determinar a melhor relação sinal/ruído do experimento, de maneira a se determinar o menor tempo possível para captação do sinal e identificação de substâncias.

(d) Levantamento de uma curva de calibração que permita obter a concentração da substância quando detectada no meio urina.

(e) Avaliação e detecção da substância *in vivo* e *in vitro*. Isto é, a obtenção dos espectros com a substância dissolvida diretamente na urina, e a obtenção do espectro diretamente da urina com a substância sendo administrado via subcutânea em animal de raça Winstar.

3.1. Laser

Foi utilizado um laser de Ti:Safira bombeado por um Laser de Argônio. Para este experimento o laser de Argônio foi sintonizado em 488 nm, com potência de 5 W e o laser de Ti:Safira em 785 nm, com potência de saída de 100 mW .

3.2 Óptica

Coletores, espelhos e lentes de quartzo foram utilizados para direcionamento do feixe laser à célula de análise. O feixe gerado pelo espalhamento Raman na amostra é emitido em todas as direções, quase que isotropicamente, de maneira que é importante projetar uma ótica de espelhos e lentes que permita a colimação da máxima quantidade de energia na abertura do espectrômetro.

3.3 Célula

As amostras de urina foram analisadas em cubeta de quartzo de 1 cm x 1 cm. Neste experimento, a potência de excitação obtida na célula de análise foi de 70 mW.

3.4 Sistema de aquisição

O sinal Raman foi coletado por um espectrógrafo Chromex, modelo 250IS e analisado em um detetor (CSMA) Princeton Instruments, modelo LN/CCD - 1024 x 1024 pixels - EHR/1, refrigerado a -95° C com nitrogênio líquido. Controlado por PC, a abertura da fenda do espectrógrafo foi ajustada em 10 μ m, e a aquisição do sinal foi configurada para realizar dez acumulações com tempo de exposição de dez segundos cada.

3.5 Filtro

Utilizou-se um filtro óptico notch, Kaiser Optical System, modelo 3570, centrado em 785 nm.

3.6 Bancada óptica

O experimento foi montado, em sala de temperatura controlada de aproximadamente 18° C, numa bancada óptica da marca Newport, 2 x 3 m, modelo com vibrastop, isolando o sistema de vibrações do ambiente.

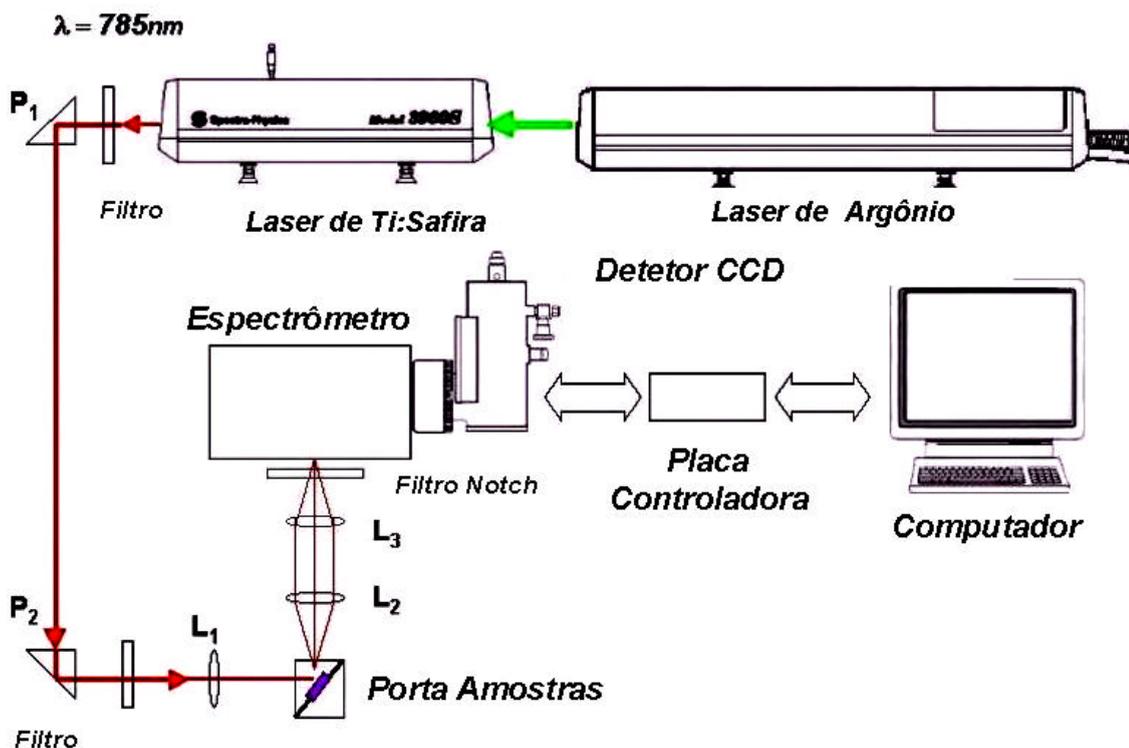


Figura 7 – Diagrama esquemático do sistema Raman.

3.7 Procedimento com urina humana

Foram realizadas medidas em cinco amostras diferentes de urina humana, obtidas por micção. Utilizou-se a média das informações espectrais como sendo o espectro da urina normal. Em seguida, adicionou-se, diretamente em uma das amostras, as seguintes concentrações de efedrina: 4,8 μ g/ml, 12 μ g/ml, 48 μ g/ml, 120 μ g/ml, 600 μ g/ml, 3mg/ml, 15mg/ml e 75mg/ml. Todas as medidas espectrais foram obtidas dentro do período de seis horas.

3.8 Procedimento com urina animal

Após estudar a inter-relação dos padrões espectrais da urina e da efedrina, foi analisada uma amostra de urina obtida em experimentação animal. Utilizou-se um rato Winstar, macho, com peso aproximado de 200 g.

A coleta da urina foi realizada pela compressão abdominal, decorrente da contenção manual. Foram realizadas duas coletas, sendo uma antes da administração da substância e outra três horas após a administração de 0,5 ml de uma concentração de 5mg/ml de cloridrato de efedrina, por via subcutânea.

3.9 Processamento dos espectros

Os espectros obtidos passaram por diversas etapas de processamento que incluem a subtração da fluorescência do material biológico, redução do nível de ruído e, calibração em frequência.

3.10 Calibração em frequência

Para esta operação utilizou-se um polinômio de ordem 3, correlacionando as posições de deslocamento Raman (cm^{-1}) de uma substância com picos conhecidos na faixa de 700 a 1600 cm^{-1} , como o indino, aos valores experimentais que são fornecidos em pixels. Seguiu-se o método padronizado para o uso de espectrômetros baseados em detectores CCD descrito por Wollman e Bohn (1993).

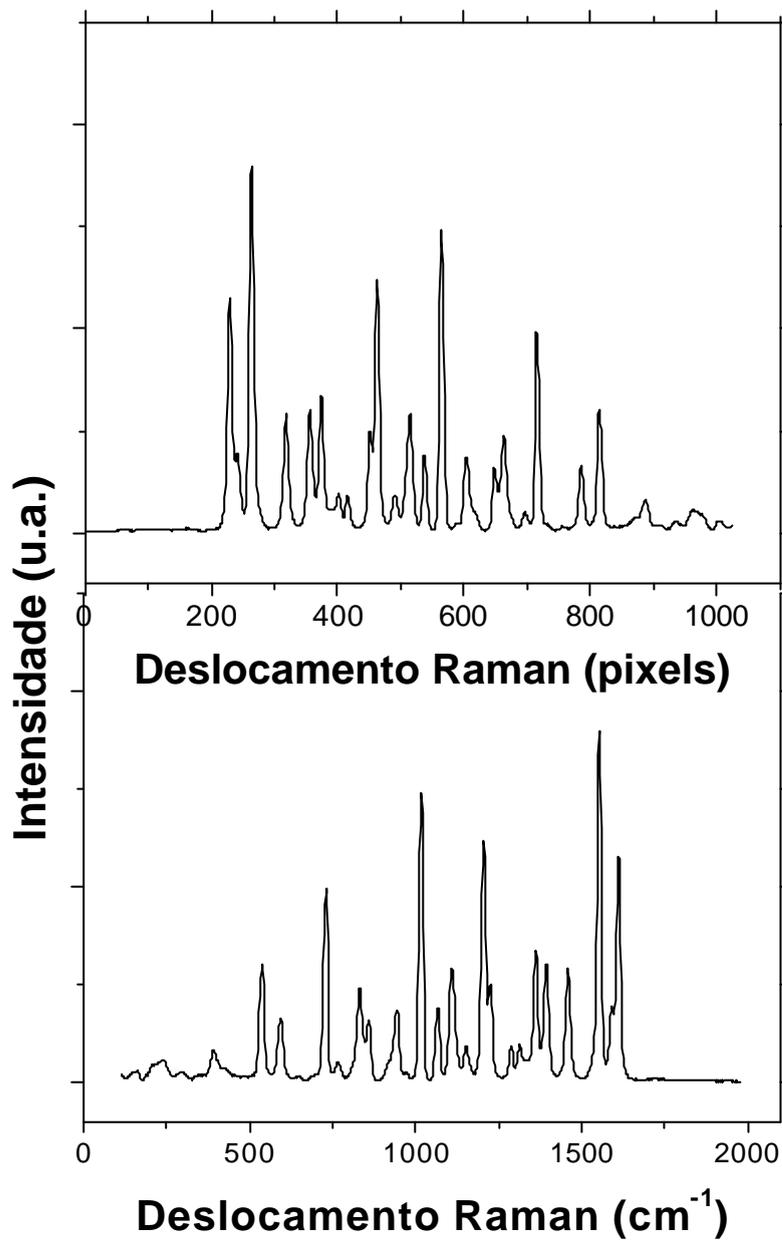


Figura 8 - Espectro da substância indinavir, apresentado em sua forma original e após a calibração do eixo das frequências.

Os novos valores convertidos em cm^{-1} , no eixo x, foram utilizados para todos os espectros obtidos, no mesmo procedimento experimental.

3.11 Subtração do fundo de fluorescência

Utilizou-se o programa matemático Origin 6.0 © (Data Analysis and Technical Graphics), para a gerar uma linha de base, por polinômio de ordem 3. Esta curva foi subtraída do espectro original, evidenciando os picos Raman do espectro.

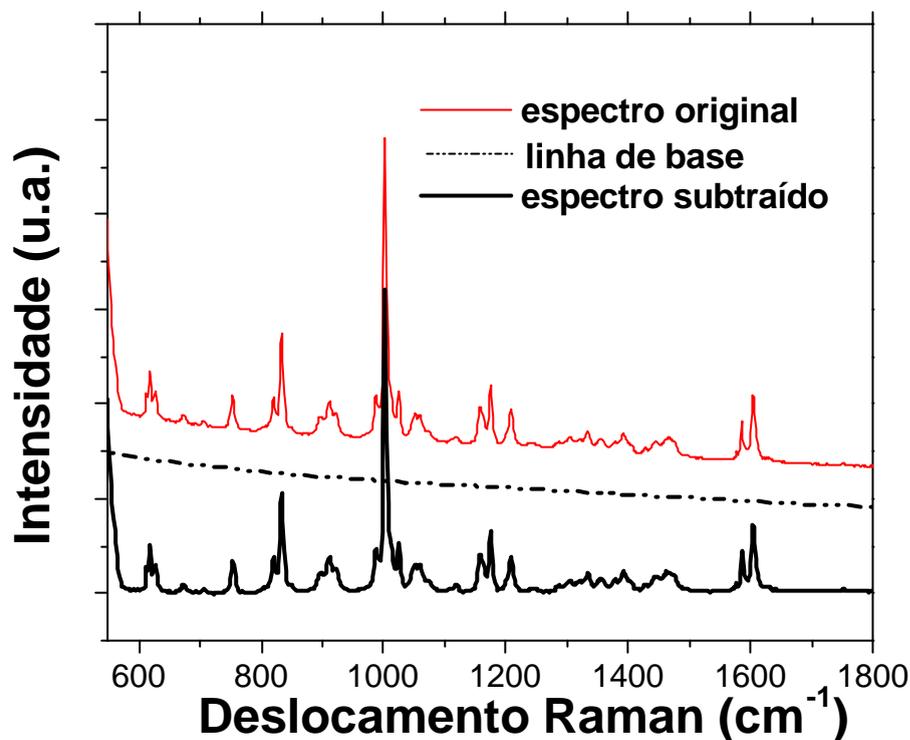


Figura 9 - Espectros de fluorescência e Raman separados graficamente.

3.12 Calibração em intensidade.

A curva de calibração foi obtida por regressão linear no gráfico das intensidades do pico Raman em 1002 cm^{-1} (unidades arbitrárias) em função das concentrações analisadas.

Para calcular-se a intensidade Raman referente à concentração de efedrina, considerou-se a intensidade do pico Raman situado em 1002 cm^{-1} , obtido após subtrair-se o espectro da urina humana padrão dos respectivos espectros analisados.

3.13 Normalização

Para ajustar as intensidades de espectros obtidos em diferentes dias de experimentação, o espectro da urina normal do rato Winstar foi normalizado em função do espectro normal da urina humana. Para isto, igualaram-se as intensidades dos picos Raman

em 1005 cm^{-1} dos espectros da urina do rato Wistar e urina humana. A intensidade do pico Raman em 1002 cm^{-1} do espectro da urina animal, após a administração da solução de efedrina, foi ajustada usando o fator de correção obtido no processo de normalização. Esta intensidade corrigida em 1002 cm^{-1} permite determinar a concentração de efedrina na amostra de urina animal usando as curvas de concentração já determinadas.

4.1 Medidas com adição artificial de efedrina em urina humana.

Na Figura 10 tem-se o espectro Raman da efedrina comercial em estado sólido obtido com irradiação direta de 70 mW contínuos no comprimento de onda de 785 nm. Utilizaram-se 10 acumulações com tempo de 10 segundos cada uma. Pode-se observar picos Raman bem definidos nas regiões de 618, 753, 834, 910, 1002, 1025, 1173, 1208, 1334, 1390, 1462 e 1603 cm^{-1} . Este espectro foi normalizado pela intensidade do pico Raman em 1002 cm^{-1} correspondente a concentração de 75 mg/ml de efedrina.

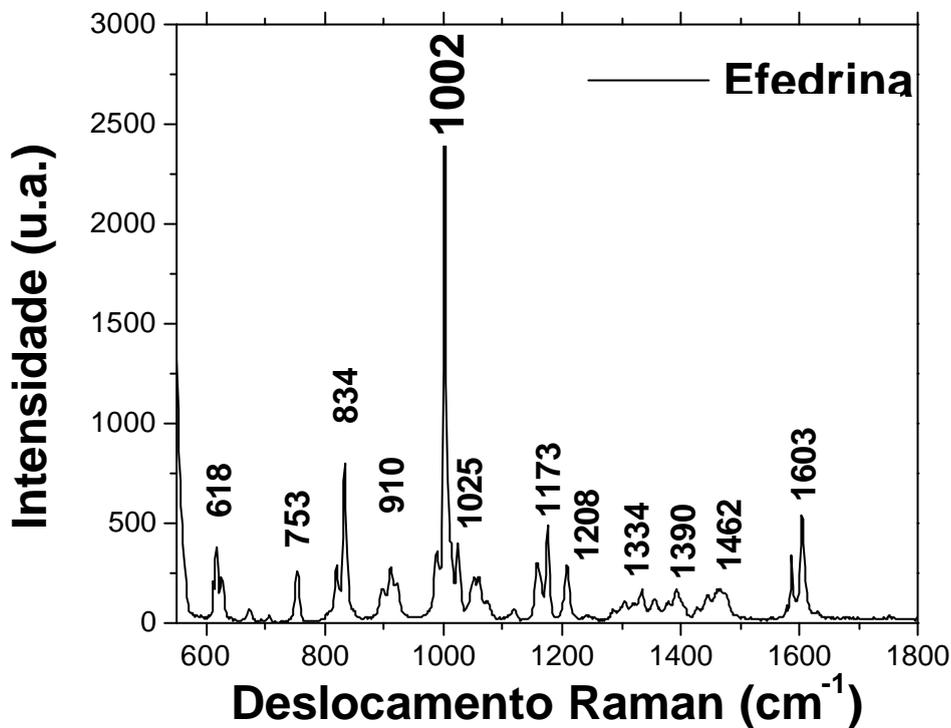


Figura 10 - Espectro Raman da efedrina.

Na Figura 11, é apresentado o Espectro Raman da urina humana sem adição de nenhum componente, obtido nas mesmas condições do espectro da Figura 10. O espectro apresentado é a média espectral obtida a partir de cinco amostras diferentes de urina onde se destaca o pico Raman situado em 1005 cm^{-1} .

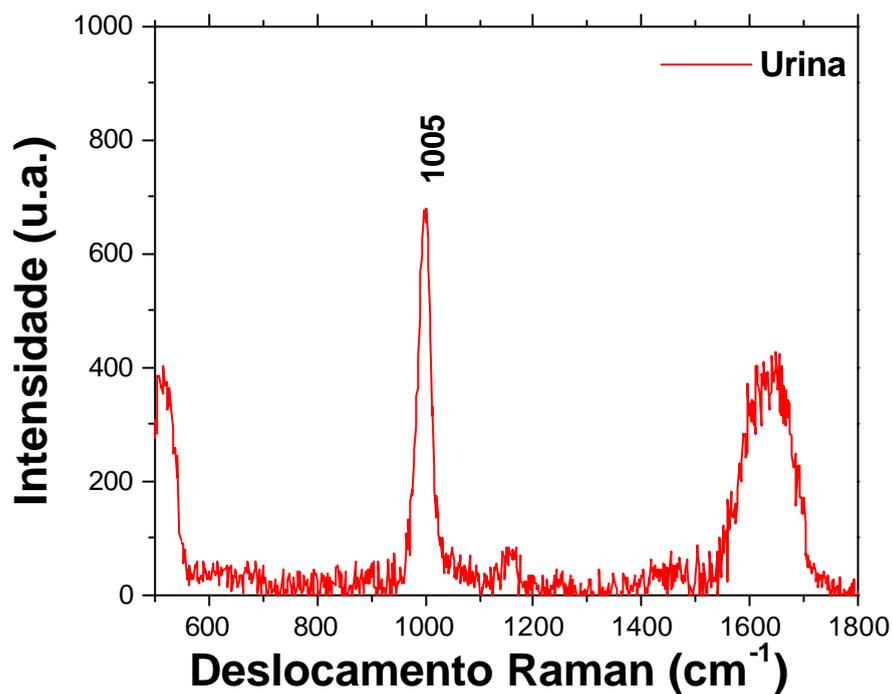


Figura 11 - Espectro Raman da Urina Humana.

Na Figura 12, temos o espectro Raman da solução de 75 mg/ml de efedrina em urina humana, que foi a maior concentração analisada. Para obter-se esta solução, diferentes concentrações de efedrina foram adicionadas progressivamente na célula de análise contendo um mililitro de urina humana. Observa-se que surgem picos situados em 618, 752, 830, 1002, 1025, 1209, 1465 e 1603 cm^{-1} característicos da substância em estudo e o pico Raman da urina em 1005 cm^{-1} é sobreposto.

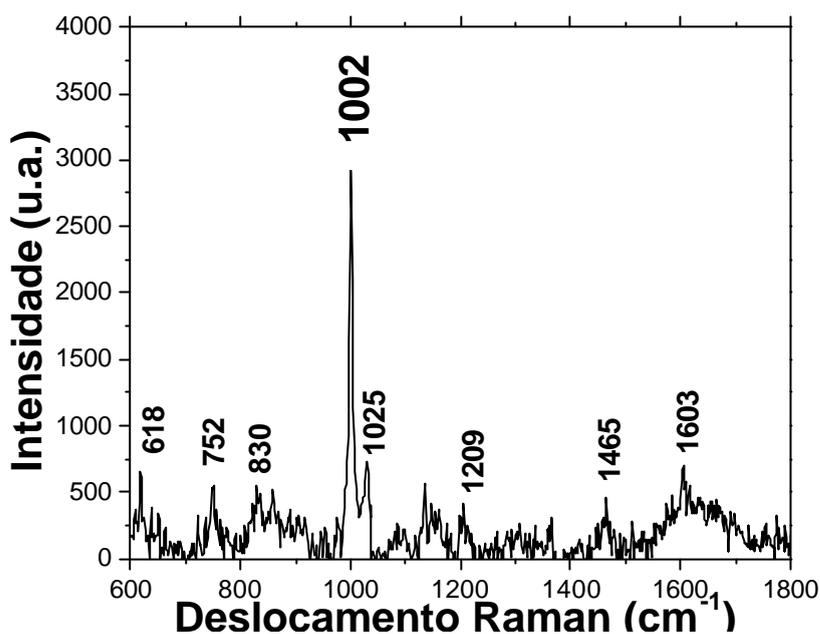


Figura 12 - Espectro para a concentração de 75mg/ml.

A análise qualitativa foi realizada pelo estudo das informações espectrais, onde detectou-se a substância de estudo no meio urina através da observação dos picos Raman característicos da efedrina.

Para quantificar as concentrações em amostras desconhecidas, uma curva de calibração foi gerada a partir das intensidades do pico 1002 cm^{-1} no espectro Raman versus a respectiva concentração adicionada.

Os componentes espectrais da substância de estudo, foram evidenciados pela subtração das informações espectrais pertencentes a urina, obtendo-se novos espectros, correspondentes as respectivas concentrações (Figura 13).

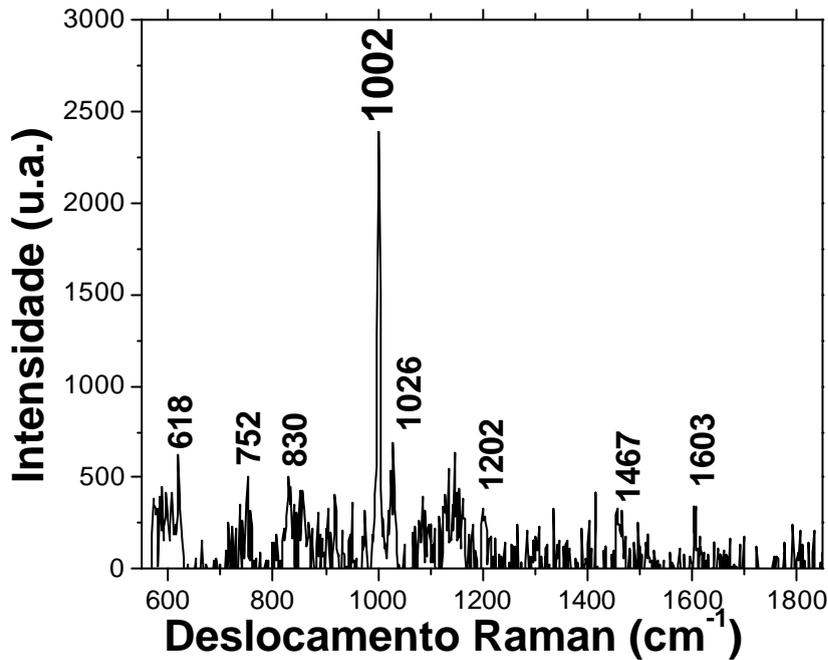


Figura 13 – Espectro da efedrina subtraído do espectro padrão de urina.

A correlação entre as intensidades relativas ao pico Raman situado em 1002 cm^{-1} , obtidas por subtração espectral (unidades arbitrárias) e as diferentes concentrações de efedrina (mg/ml) que foram diretamente adicionadas, geraram a curva de calibração de intensidade apresentada na Figura 14, que foi utilizada para análise quantitativa.

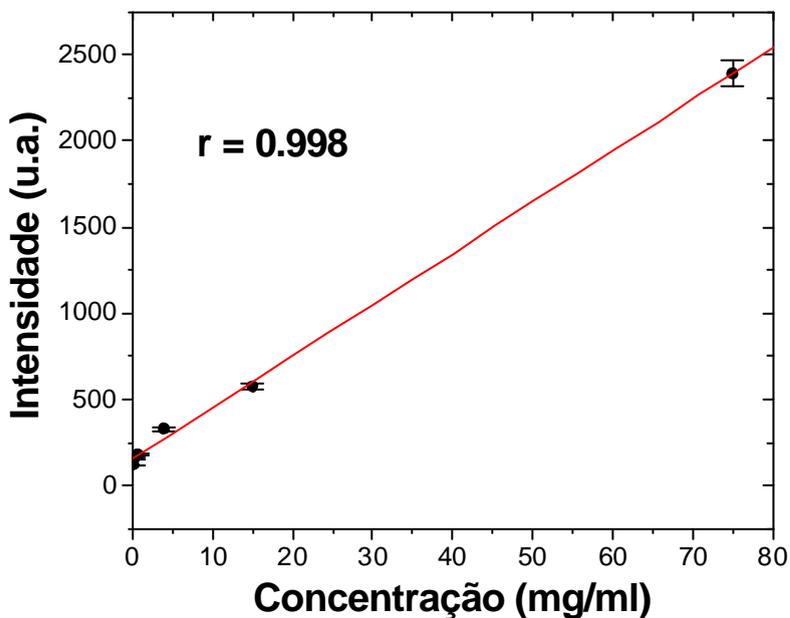


Figura 14 – Intensidade do pico Raman versus concentração de efedrina na urina humana.

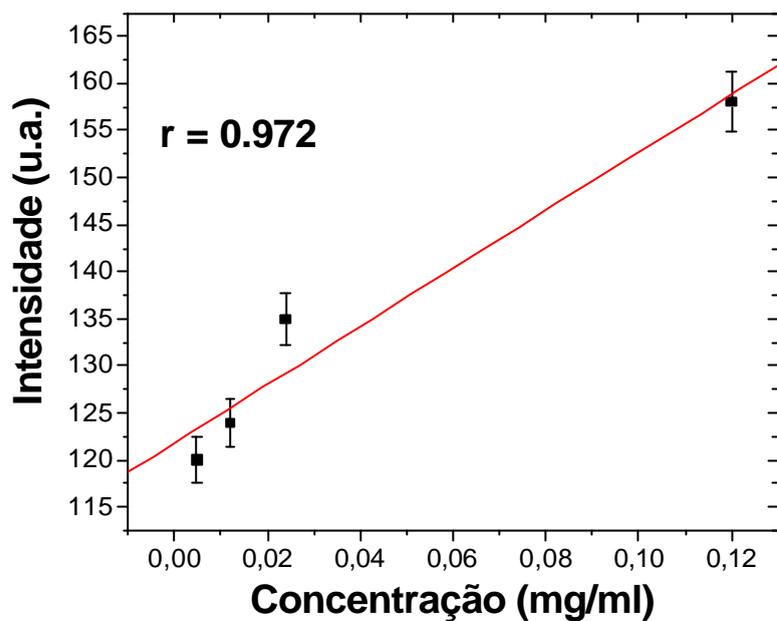


Figura 15 – Intensidade do pico Raman versus concentração de efedrina na urina, para as quatro menores concentrações.

O espectro na Figura 16 apresenta a intensidade do pico Raman situado em 1002 cm^{-1} para a concentração de $4,8\text{ }\mu\text{g/ml}$ que foi a menor concentração analisada. Pode-se observar a boa relação sinal ruído, permitindo diferenciar claramente o pico Raman de interesse.

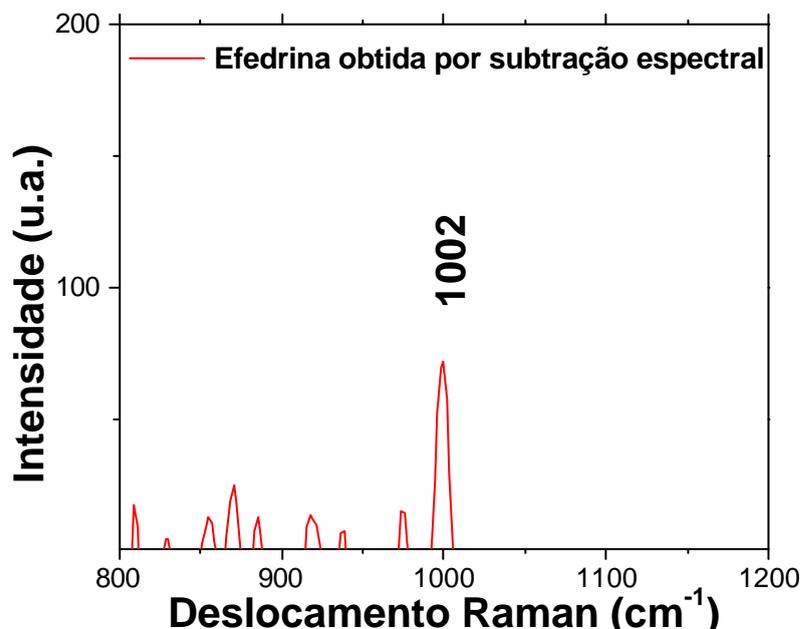


Figura 16 – Espectro da efedrina subtraída da solução com concentração de $4,8\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Após demonstrar plenas condições para identificar e quantificar diferentes concentrações de efedrina em urina humana, analisou-se uma amostra de urina de rato Winstar a fim de comparar as informações espectrais entre os espectros humano e animal.

4.2 Medidas comparativas em experimentação animal

Devido a semelhança das informações espectrais observadas na Figura 17, uma nova amostra foi analisada após a administração subcutânea da substância de estudo.

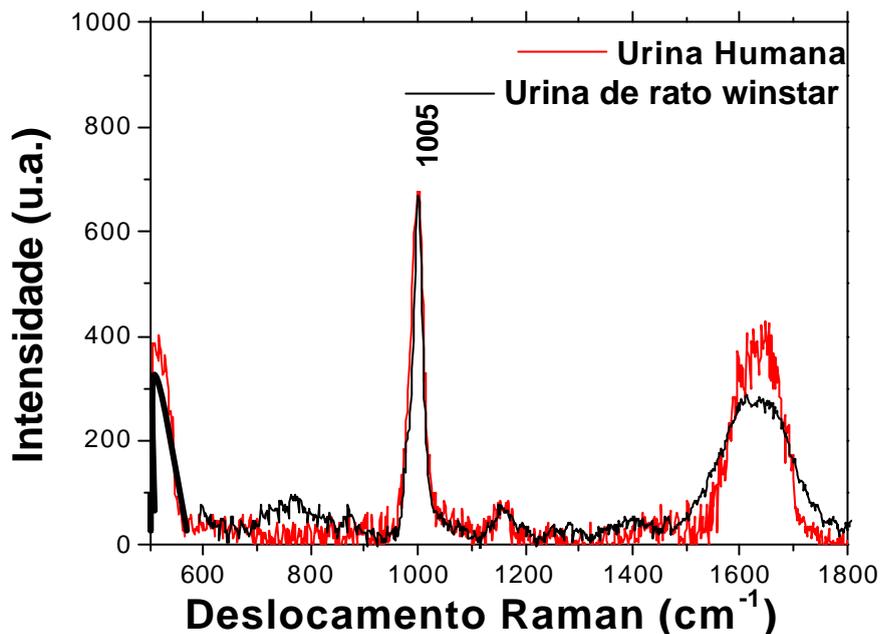


Figura 17 – Comparação entre o espectro Raman de urina humana e de urina de rato Winstar.

4.3 Medidas com a droga sendo administrada ao animal e coletada via urina.

Observa-se na Figura 18, o surgimento dos picos Raman situados em 1002 cm^{-1} e 1603 cm^{-1} . Neste espectro, verifica-se o ganho em intensidade na região de 1000 cm^{-1} , onde é verificado o pico Raman mais intenso da substância de estudo. De forma similar aos resultados prévios em urina humana, o pico Raman da urina em 1005 cm^{-1} , também é sobreposto.

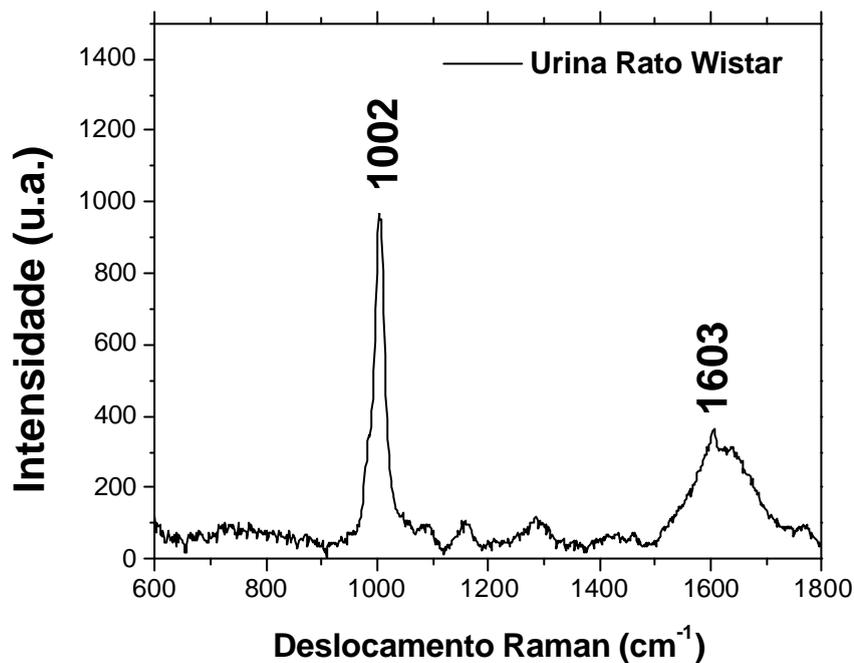


Figura 18 – Espectro Raman de urina animal após a administração de efedrina.

Utilizando a metodologia de processamento dos espectros, anteriormente demonstrada, esta amostra contendo uma concentração desconhecida de efedrina, foi quantificada a partir da intensidade do pico Raman situado em 1002 cm⁻¹ obtido por subtração espectral entre os componentes Raman da amostra analisada e da urina normal.

A intensidade obtida para o pico Raman situado em 1002 cm⁻¹ (Figura 19) foi analisada através da curva de calibração obtida anteriormente, onde pode obter-se o valor correspondente a 0,57 mg/ml para a concentração de efedrina, através da interpolação de valores.

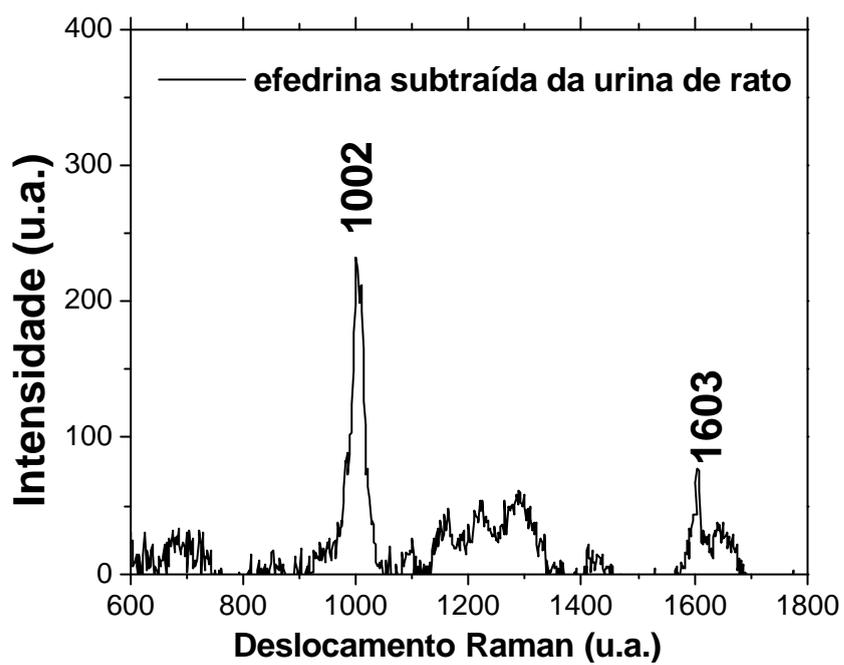


Figura 19 - Efedrina em urina de rato após administração subcutânea, subtraída do espectro de urina normal.

4. Discussão.

Para demonstrar a aplicação da técnica proposta no trabalho, as etapas abaixo relacionadas, estabelecem uma seqüência lógica para execução e análise dos procedimentos.

Algumas considerações serão apresentadas a seguir, permitindo detalhar importantes aspectos sobre as fases concluídas neste trabalho.

5.1 Seleção do comprimento de onda de excitação

O sistema Laser de Argônio e Laser de Ti:Safira permite selecionar valores de comprimento de onda de emissão entre 650 nm e 1050 nm. O laser de Ti: Safira é um laser contínuo de meio ativo sólido, de baixa potência (cerca de 200mW), chamado de laser passivo, por não possuir uma fonte de alimentação para excitar o meio ativo, no caso, um cristal de Safira dopado com Titânio. Para que isto ocorra, a excitação do cristal de Ti:Safira é realizada pelo laser de Argônio, denominado laser de bombeio, cujo desempenho é de fundamental importância para a potência de saída do laser de Ti: Safira. O laser de Argônio utilizado é um laser contínuo de meio ativo gasoso de alta potência (cerca de 5 W), com espectro eletromagnético na região do visível situado de 488 a 514nm (azul-verde).

Uma limitação deste sistema deve-se ao fato de que a intensidade do sinal Raman pode mudar com a flutuação da potência do laser e/ou de pequenas variações no sistema óptico que envolve a amostra, como por exemplo, possíveis perdas nos revestimentos de espelho, perdas dos elementos de ajuste, pela potência de bombeio disponível, e pela qualidade do modo do bombeio (DOU et. al 1997). Pode ocorrer também, variação de intensidade principalmente quando compara-se espectros obtidos em dias diferentes. Esta situação é contornada pela normalização dos novos espectros analisados, em função dos valores obtidos para criação da curva de calibração.

Os comprimentos de onda nas extremidades desta faixa de seleção apresentam problemas devido a forte fluorescência produzida por tecidos biológicos (início da faixa) e limite de detecção espectral dos detectores de silício do CCD (final da faixa). Considerando estes fatores, foi sintonizado em 785 nm (ADAR, GEIGER, NOONAN, 1997; HIRSCHFELD, CHASE, 1986; KHALIL, 1999).

5.2 Sistema de captação do sinal Raman

Os resultados são interpretados avaliando-se as intensidades e posições dos picos Raman no espectro da solução. A intensidade dos picos depende da eficiência da geração do pico Raman em uma ligação química específica, da quantidade de radiação do laser de excitação (tempo de exposição e o número e acumulações) e da abertura da fenda do espectrômetro. Este último parâmetro atua também na resolução do equipamento, sendo que no presente experimento, foi necessário reduzir a abertura da fenda para 10 μm de maneira que fosse possível ao sistema resolver dois picos Raman extremamente próximos. Mantendo-se todas as condições acima inalteradas em todas as medidas, a intensidade de cada pico Raman é proporcional a quantidade de moléculas que estão sendo irradiadas pelo laser de excitação, neste caso, à concentração da solução.

A obtenção de uma melhor resolução através da redução da fenda do espectrógrafo para 10 μm , foi necessária devido a proximidade do pico Raman da efedrina em 1002 cm^{-1} (Figura 10) e, do pico Raman da urina na mesma região, 1005 cm^{-1} (Figura 11). Este procedimento reduziu a relação sinal-ruído do espectro devido a menor quantidade de radiação dentro do sistema.

5.3 Picos observados no espectro Raman da urina

Na Figura 11, pode-se identificar o pico da uréia localizado em 1005 cm^{-1} e duas bandas expressivas (picos mais alargados) em torno de 600 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , que aparecem em virtude da presença de água, que é um dos principais constituintes da urina (DOU et. al, 1997).

5.4 Picos observados no espectro Raman da efedrina em urina humana

O modo vibracional correspondente a vibração do anel aromático (ring breathing) na região de 1002 cm^{-1} e o modo vibracional correspondente a vibração de estiramento de fenil - C duplo C (phenyl stretching C=C) na região de 1600 cm^{-1} foram relatados na identificação de codeína em urina através de técnica SERS (Surface-enhanced Raman scattering). Segundo este estudo, determinadas “famílias” de substâncias têm um teste padrão característico de faixa podendo, conseqüentemente, ser identificadas (TRACHTA et. al, 2004).

Qualitativamente, os resultados confirmam a detecção da presença da efedrina através da repetição dos picos da droga (Figura 10) na amostra analisada (Figura 12). Para análise dos resultados, ferramentas matemáticas são utilizadas para auxiliar na interpretação dos espectros. Na Figura 20, o espectro C é a composição dos espectros A e B (obtidos nas Figuras 10 e 11) na região de 950 a 1050 cm^{-1} . Pode-se observar um alargamento do pico em 1002 cm^{-1} , em função do pico da urina em 1005 cm^{-1} .

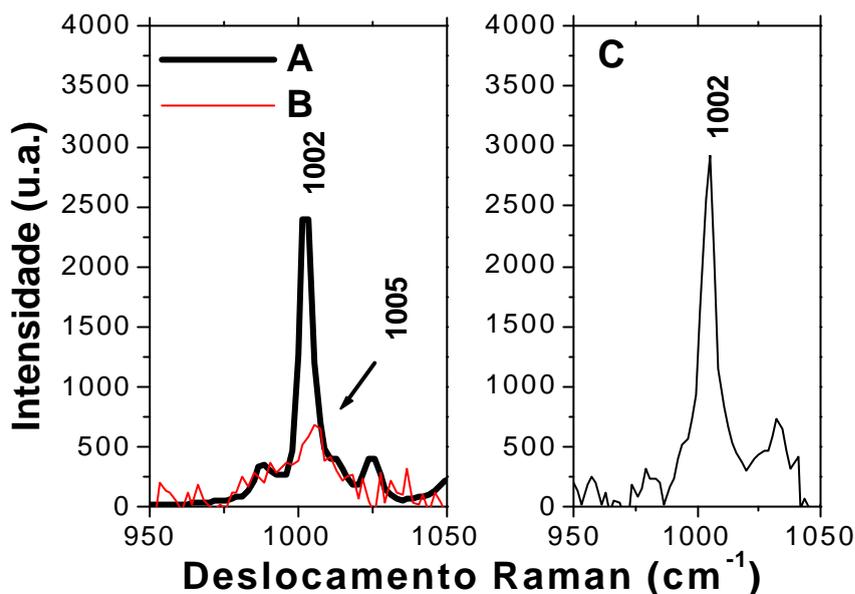


Figura 20 - Espectro Raman da efedrina (A), Espectro Raman da urina (B) e composição espectral (C) na região de 950 a 1050 cm^{-1} .

A comparação da composição espectral das substâncias isoladas (Figura 20) e do espectro obtido experimentalmente em solução (Figura 12) é apresentada na Figura 21. Evidencia-se uma grande semelhança entre estes espectros (Figuras 12 e Figura 20), quando estas são apresentadas em sobreposição, principalmente na posição, intensidade e largura de faixa do pico que caracteriza a efedrina, em 1002 cm^{-1} .

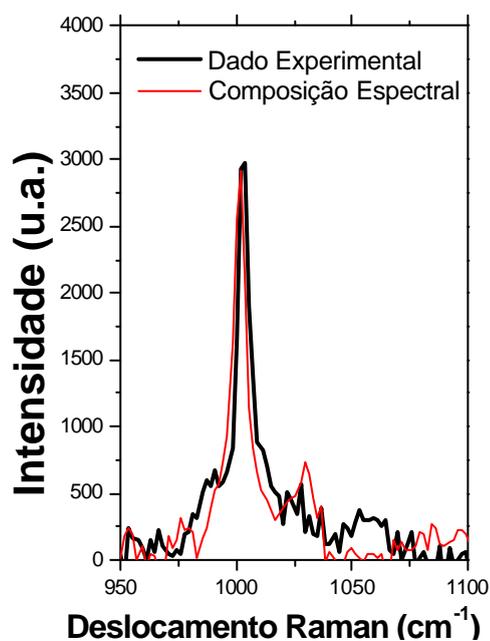


Figura 21 – Comparação entre processamento matemático e dados experimentais, na região de 950 a 1050 cm^{-1} .

O procedimento de composição espectral, realizado pela soma dos espectros A e B (Figuras 10 e 11), na região de 1400 a 1800 cm^{-1} , geraram o espectro C na Figura 22.

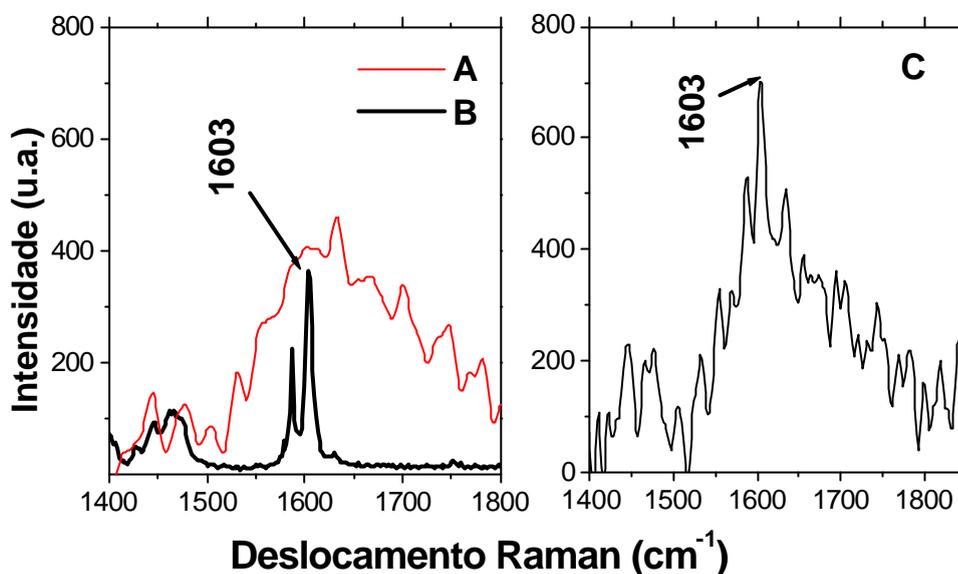


Figura 22 - Espectro Raman da urina (A), Espectro Raman da efedrina (B) e composição espectral (C) na região de 1400 a 1800 cm^{-1} .

Da mesma forma como demonstrado anteriormente, a Figura 23, apresenta uma grande semelhança com o espectro da substância em solução (Figura 12).

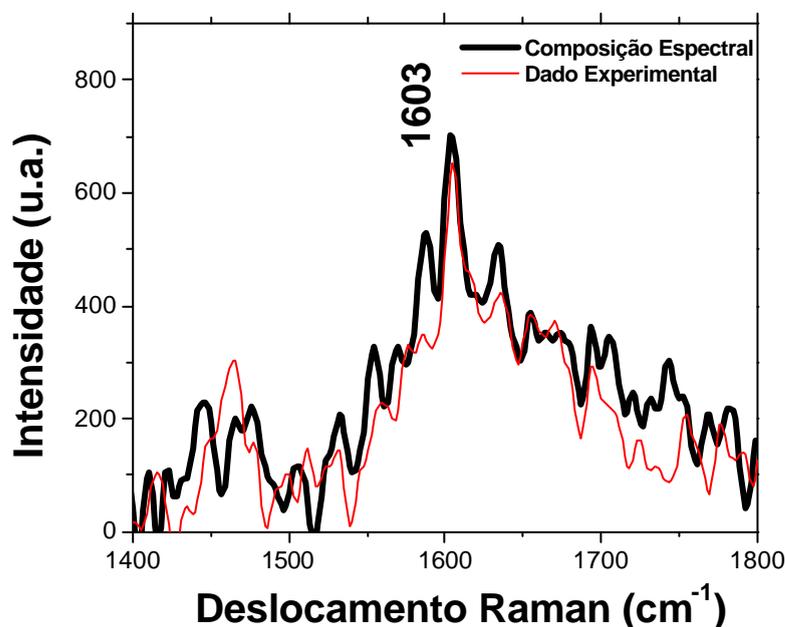


Figura 23 – Comparação entre processamento matemático e dados experimentais na região 1400 a 1800 cm^{-1} .

O processamento apresentado (Figuras 20, 21, 22 e 23) demonstra que as diferenças apresentadas entre as Figuras 11 e 12, ou seja, as diferenças espectrais entre a

urina humana padrão e a solução contendo 75 mg/ml de efedrina em urina humana, são decorrentes da presença da substância de estudo. Este procedimento foi utilizado devido a grande proximidade dos picos de interesse na região em torno de 1000 cm^{-1} (pico em 1002 cm^{-1} , característico da efedrina e do pico Raman em 1005 cm^{-1} , característico da urina) e do limite mínimo de resolução de 6 cm^{-1} para se manter ainda uma relação razoável de sinal-ruído.

É possível contudo, que a análise de outras substâncias em interação com a urina apresente picos de interesse em regiões distintas, não repetindo situações deste tipo. Entretanto, mesmo em condições mais complexas como a apresentada, foi possível demonstrar a utilização da técnica NIRS para detecção da substância de estudo.

5.5 Curva de concentração versus intensidade de pico Raman

Para gerar a curva de calibração, as informações espectrais da efedrina são separadas do espectro da solução analisada, subtraindo-se os componentes espectrais da urina padrão a partir dos espectros das soluções analisadas. Na Figura 13, o espectro da efedrina obtido pela subtração espectral assemelha-se bastante com o espectro da efedrina pura, indicado na Figura 10. Como pode ser observado a intensidade do pico Raman da efedrina em 1002 cm^{-1} é recuperada de acordo com a Figura 10.

Embora a intensidade do sinal Raman no sistema tenha caído com a diminuição da concentração analisada, é demonstrado, que a qualidade das medidas espectrais obtidas para as quatro menores concentrações (Figura 15), permite considerar valores de ordem prática, uma vez que o índice de correlação linear diminuiu apenas de 0,998 (Figura 14) para 0,972 nesta faixa de valores.

5.6 Limite de detecção

A menor concentração detectada neste estudo em urina humana, foi de 4,8 $\mu\text{g/ml}$. Embora o sistema ainda evidenciasse uma relação sinal ruído boa, (10:1) sendo possível a observação de efedrina na urina em concentrações ainda menores que esta, estimam-se condições para medir valores, em torno de 800ng/ml. Entretanto para este trabalho, a mínima concentração utilizada foi considerada satisfatória por já se encontrar abaixo dos valores preconizados pelo COI como doping, ou seja, abaixo de 10 $\mu\text{g/ml}$.

5.7 Resultados do experimento com animal

A comparação dos espectros de urina humana e urina de rato Winstar (Figura 17) demonstra a semelhança das informações espectrais principalmente com relação a região de 1005 cm^{-1} que foi utilizada para normalizar a intensidade dos espectros destas amostras.

O espectro na Figura 18 apresenta a medida realizada em uma amostra de urina de rato, coletada após a administração subcutânea de 5mg/ml de efedrina. Neste espectro identifica-se o deslocamento Raman situado em 1002 cm^{-1} que é característico da efedrina (Figura 10).

A curva de calibração obtida pela adição de efedrina diretamente na urina, quando plotou-se a intensidade do pico da efedrina em 1002 cm^{-1} versus a concentração conhecida da solução, foi utilizada quando da detecção da efedrina na urina do rato, administrada via subcutânea para se determinar sua concentração, via interpolação dos resultados. A intensidade do pico Raman em 1002 cm^{-1} , nesta amostra foi obtida pela subtração espectral do componente da urina padrão.

5.8 Trabalhos futuros

Deve haver a comparação dos resultados obtidos neste sistema com exames realizados em laboratório autorizado pelo COI, obtendo-se a validação plena da técnica. Após todos estes ajustes, o sistema deve testar outras substâncias, buscando atingir a totalidade da lista de substâncias proibidas pelo COI.

Outra possibilidade que deverá ser investigada futuramente, é o processo transcutâneo, que devido a complexidade técnica envolvida em medidas *in vivo*, exige considerar cuidadosamente parâmetros como: o espalhamento dos tecidos biológicos, o local mais adequado para a realização da medida, a interferência do fundo de fluorescência, os efeitos dermatológicos da excitação do laser, métodos para calibração do sinal em frequência e a intensidade da concentração dos parâmetros analisados (ERKENS et. al, 1994; WICKSTED et. al, 1995).

Um monitoramento NI deve processar os sinais ópticos transmitidos através ou refletidos pela córnea, camadas da derme e epiderme, de forma subcutânea, pelo líquido intersticial, e por acesso vascular (sangue arterial e venoso), que representam compartimentos independentes. Cada um destes compartimentos pode ter diferentes

propriedades óticas, de concentrações de interferentes, e de metabólicos de interesse. É preciso considerar que um valor determinado NI pode representar um valor médio de concentrações diferentes, e a correlação entre uma medida NI e uma medida do sangue pode variar pelo local do corpo, dependendo das diferenças no tecido e em propriedades vasculares de cada local (MENDELSON, 1992).

O local da medida é um fator crítico. Alguns estudos destinados a análise NI de glicose têm sugerido diferentes locais como a ponta do dedo (JAGEMANN et al., 1995; ROBINSON et al., 1999), a parte interna do lábio inferior (HEISE et. al, 1994; HEISE; 1996; MARBACH et. al, 1999), o antebraço (MALIN et al., 1999), o tecido entre o polegar e o dedo indicador (HAZEN, 1995).

Outros autores têm sugerido o olho como um local para medidas da concentração de glicose usando a espectroscopia Raman (BORCHERT, STORRIE-LOMBARDI; LAMBERT, 1999; CAMERON et. al, 1999; STEFFES; 1999). A razão para esta escolha, deve-se a diminuição do elevado fundo de fluorescência, característico em tecidos altamente vascularizados (BERGER; WANG; FELD, 1996; BERGER et.al, 1996; GOETZ et. al., 1995; KHALIL, 1999; LAMBERT; STORRIE-LOMBARDI; BORCHERT, 1998; TARR, 1991; WANG et. al, 1993; WICKSTED et. al, 1994). Existem, porém, algumas desvantagens na utilização desta via, principalmente com relação à potência de excitação do laser. Isto significa um limite crítico, pois a potência deve estar suficientemente baixa para impedir ferimento, mas este fato reduz significativamente a relação sinal-ruído.

No caso específico do controle antidoping, esta metodologia deve ser aplicada para definir o local mais adequado para a realização da medida NI, permitindo detectar e quantificar, convenientemente, a lista de substâncias proibidas pelo COI.

Considerando que a excitação IR (infravermelho, abreviado da língua inglesa) e NIR é capaz de determinar quantitativamente baixas concentrações de glicose, *in vivo*, um outro aspecto que deve ser considerado é o processamento do sinal Raman. Neste caso será preciso separar as informações desejadas dentre um conjunto total de informações espectrais, obtidas no tecido biológico que fornece um sinal composto sobrepondo o espectro Raman da substância que está sendo monitorada (COTÉ, 1997).

No presente estudo, o processamento computacional demonstrou plenas condições de separar os principais componentes espectrais envolvidos: o espectro Raman da urina normal, o espectro Raman da efedrina e o fundo de fluorescência.

Porém, em medidas mais complexas, como é o caso NI, é necessário assumir critérios que evitem erros de ajustes ou perda de informações na eliminação de ruídos, sem afetar a fidelidade da apresentação dos dados. Este método deve envolver as seguintes etapas:

- (a) medida de um sinal óptico do parâmetro investigado em uma matriz simples;
- (b) aumentos progressivos na complexidade da matriz para imitar tecidos humanos;
- (c) demonstração da exatidão e da precisão em cada etapa; e
- (d) correlação dos dados com um modelo matemático para a propagação clara no tecido.

Finalmente, o sistema da detecção e o método da medida são aplicados às peças corporais. Sinais *in vivo* são correlacionados outra vez com os dados invasivos pelo uso de técnicas convencionais. Esta aproximação passo-a-passo permite a identificação de componentes de ruído, permitindo traçar estratégias a fim de minimizar sua contribuição ao sinal antes do uso de técnicas de medida (KHALIL, 1999).

A evolução prática para medidas NI exigirá um sistema fechado, que não seja afetado por fatores ambientais, algoritmos simplificados de calibração, com eletrônica e sistemas óticos compactos (KHALIL, 1999).

Diversas tecnologias têm o potencial para conduzir aos dispositivos de medição viável, mas os dados são baseados mais sobre a experimentação *in vitro*. (KHALIL, 1999).

Uma aproximação empírica, para medidas NI, deve envolver as seguintes etapas:

- (a) coleta de sinais NI do grupo controle e do grupo de estudo;
- (b) medida simultânea de concentrações do parâmetro de estudo por um método invasivo;
- (c) modelos do cálculo baseados na correlação entre valores laboratoriais e os sinais óticos medidos NI.

Esta metodologia considera a presença de outros metabólicos, do ruído biológico, a variabilidade de aquisição do sinal, gerada no acoplamento do cateter óptico com o corpo, tentando separa computacionalmente os parâmetros de interesse. O número das variáveis e a complexidade da análise de dados necessita o uso de técnicas multivariadas tais como a

análise de componentes principais ou os métodos artificiais de rede neurais (HAALAND, 1990; MARTENS, NAES, 1989)

Após testar a detecção da substância de interesse no sistema de bancada, é possível desenvolver um sistema compacto que pode contar com rotinas de processamento e oferecer o resultado em tempo real (DOU et. al, 1997).

Certamente, a possibilidade de diagnóstico transcutâneo, que é uma grande promessa, fará a ER ser considerada como uma grande esperança para o controle do doping permitindo que os todos os atletas possam ser diagnosticados antes da realização da prova, bem como em procedimentos de controle fora de competição, minimizando consideravelmente os procedimentos para a coleta do material.

6 Conclusão

O Sistema Raman conseguiu diferenciar com sucesso os espectros da urina normal com o da solução de 75mg/ml de efedrina através dos picos localizados em 618, 753, 834, 1002, 1025, 1209, 1465 e 1603 cm^{-1} , que não são comuns na Urina em sua forma natural. No processo metabólico, os marcadores que apresentaram maior clareza com relação à presença da efedrina na amostra de urina foram os picos situados em 1002 cm^{-1} e 1603 cm^{-1} .

A concentração detectada neste estudo foi 0,57 mg/ml e a mínima concentração medida para gerar a calibração de intensidade foi de 4,8 $\mu\text{g/ml}$, está duas vezes abaixo do limite caracterizado como positivo para a efedrina, demonstrando que a técnica NIRS apresenta sensibilidade adequada para detectar esta droga em concentrações de ordem prática.

7 Referências Bibliográficas

ADAR, F.; GEIGER, R.; NOONAN, J. **Appl. Spectrosc. Rev**, v.32, p.45, 1997.

ALLEN, W.K.; SEALS, D.R.; HURLEY, B.; HAGBERG, J.M. Lactate threshold and distance running performance in young and older endurance athletes. **J Appl Physiol.**, v.58, p.1281-1284, 1985.

AQUINO NETO, F.R. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Rev Bras Med Esporte**, v.7, n.4, 2001.

BALL, D.W. Rayleigh and Raman scattering. **Spectrosc.**, v.16, n.2, p.28-31, 2001.

BARON, B.; DEKERLE, J.; ROBIN, S.; NEVIERE, R.; DUPONT, L.; MATRAN, R.; VANVELCENAHHER, J.; ROBIN, H.; PELAYO, P. Maximal Lactate Steady State Does Not Correspond to a Complete Physiological Steady State. **Int J Sports Med.**, v.24, n.8, p.582-587, 2003.

BAUMGARTNER, W.A.; HILL, V.A. Hair analysis for drugs of abuse. In : SUNSHINE, I. (ed.). **Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.577-587.

BAUMGARTNER, W.A.; HILL, V.A. Sample preparation techniques. **Forensic Sci Int.**, v.63, p.121-135, 1993.

BELL, A.F.; BARRON, L.D.; HECH, L. Vibrational Raman optical activity study of D-glucose. **Carbohydr Res.**, v.257, p.11-24, 1994.

BERGER, A.J.; BRENNAN, J.F. III; DASARI, R.R.; FELD, M.S.; ITZKAN, I.; TANAKA, K. **Apparatus and method of Raman spectroscopy for analysis of blood gases and analytes**. International patent WO96/29925. International publication published under the Patent Cooperation Treaty (PCT) 1996.

BERGER, A.J.; WANG, Y.; FELD, M.S. Rapid, noninvasive concentration measurements of aqueous biological analytes by near-infrared Raman spectroscopy. **Appl Opt.**, v.35, p.209-212, 1996.

BERGER, A.J.; ITZKAN, I.; FELD, M.S. Feasibility of measuring blood glucose concentration by near infrared Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta A**, v.53, p.287-292, 1997.

BISHOP, D. The Validity of Physiological Variables to Assess Training Intensity in Kayak Athletes. **Int J Sports Med.**, v.25, n.1, p.68-72, 2004.

BOHN, A.M.; KHODAEI, M.; SCHWENK, T.L. Ephedrine and other stimulants as ergogenic aids. **Curr Sports Med Rep. Review.** v.2, n.4, p.220-5, 2003.

BORCHERT, M.S.; STORRIE-LOMBARDI, M.C.; LAMBERT, J.L. A non-invasive glucose monitor: preliminary results in rabbits. **Diabetes Technol Ther.**, v.1, p.145-151, 1999.

BOYLE, W.S.; SMITH, G.E. Charge coupled semiconductor devices. **Bell System Tech. J.**, v.49, p.587, 1970.

CAMERON, B.D.; GORDE, H.W.; SATHEESAN, B.; COTÉ, GL. The use of polarized laser light through the eye for noninvasive glucose monitoring. **Diabetes Technol Ther.**, v.1, n.2, p.135-143, 1999.

CAREY, P.R. **Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies.** New York, NY: Academic Press, 1982.

CAREY, P.R. Raman Spectroscopy, the Sleeping Giant in Structural Biology, Awakes. **J Biol Chem.**, v. 274, n.38, p.26625-26628, 1999.

CHEONG, W.F.; PRAHL, S.A.; WELCH, A.D. A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE J. J Quant Electron** v.26, p.2166-2185, 1990.

COSTILL, D.L. The relationship between selected physiological variables and distance running performance. **J Sports Med Phys Fitn.**, v.7, p. 610-616, 1976.

COTÉ, G.L. Noninvasive optical glucose sensing: an overview. **J. Clin. Eng.**, v.22, p.253-259, 1997.

COTÉ, G.L.; CAMERON, B.D. Noninvasive polarimetric measurement of glucose in cell culture media. **J. Biomed. Opt.**, v.2, p.275-281, 1997

COTÉ, G.L. Noninvasive and Minimally-Invasive Optical Monitoring Technologies. **Journal of Nutrition**, v.13, p1596S-1604S, 2001.

DE ROSE, E.H.; FEDER, M.G.; BENTO, R.M.A.; AQUINO NETO, F.R. **Informações sobre o uso de Medicamentos no Esporte**. 4.ed. Rio de Janeiro: Comitê Olímpico Brasileiro. Departamento Médico, 2004.

DIERKER, S.B.; MURRAY, C.A.; LEGRANGE, J.D.; SCHLOTTER, N.E. Characterization of order in Langmuir-Blodgett monolayers by unenhanced Raman spectroscopy, **Chem. Phys. Lett.**, v. 137, p.453, 1987.

DIRIX, A.; KNUTTGEN, H. E.; TITELL, K. **Olympic Book Of Sports Medicine**. Londres: Blacwell, 1988.

DONG, J.; DINAKARPANDIAN, D.; CAREY, P.R. **Appl. Spectrosc.**, v.52, p.1117-1122, 1998.

DOU, X.; UENOYAMA, H. Inventors. Apparatus and method for measuring concentration of components with light scattering. **US patent.**, v.5, n.481, p.113, 1996.

DOU, X.; YAMAGUCHI, Y.; YAMAMATO, H.; HARUMI, H.; OZAKI, Y. Biological applications of anti-Stokes Raman spectroscopy: quantitative analysis of glucose in plasma and serum by a highly sensitive multichannel Raman spectrometer. **Appl Spectrosc.**, v. 50, p.1301-1306, 1996.

DOU, X.; YAMAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, H.; DOI, S.; OZAKI, Y. A Highly Sensitive Compact Raman system without a spectrometer for quantitative analysis of biological samples. **Vib Spectrosc.**, v.14, p.199-205, 1997.

DUARTE, J.; PACHECO, M.T.T.; MACHADO, R.Z.; SILVEIRA, L. JR.; ZANGARO, R.A.; VILLAVERDE, A.B. Use of near-infrared Raman spectroscopy to detect IgG and IgM antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum samples of domestic cats. **Cell Mol Biol** (Noisy-le-grand), v.48, n5, p.585-589, 2002.

DULLOO, A.G.; SEYDOUX, J.; GIRARDIER, L. Potentiation of the thermogenic antiobesity effects of ephedrine by dietary methylxantines: adenosine antagonism or phosphodiesterase inhibition. **Metabolism** v.41, p.1233-1241, 1992.

DUPONT, R.L. Medicines and drugs testing in the workplace. **J Psychoact Drugs**. v. 22, p.451-459, 1990.

DUPONT, R.L. **Effective employee assistance programs**. In: J. A. Eisenach and AJ Cowin (eds.). How to ensure a Drug-free Congressional Office, the Heritage Foundation, Washington, DC, p.29-36, 1991.

EDSALL, J.T. **J. Chem. Phys.**, v.4, p.1-6, 1936.

EDWARDS, A.D.; RICHARDSON, C.; VAN DER ZEE, P.; ELWELL, C.; WYATT, J.S.; COPE, M.; DELPY, D.T.; REYNOLDS, E.O.R. Measurement of hemoglobin flow and blood flow by near-IR laser Doppler spectroscopy. **J Appl Physiol**. v.75,p.1884-1889, 1993.

ERKENS, R.J.; WICKSTED, J.P.; MOTAMEDI, M.; MARCH, W.F. Monitoring of glucose, urea and lactate through the animal cornea using laser Raman spectroscopy. **Investig Ophth Vis Sci.**, v.35, p.2054, 1994.

FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.; GONÇALVES, N.S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Quím. Nova**, v.20, n.3, p.319-323, 1997.

FARRELL, P.A.; WILMORE, J.H.; COYLE, E.F.; BILLING, J.E.; COSTILL, D.L. Plasma lactate accumulation and distance running performance. **Med Sci Sports.**, v.11, p.338-334, 1979.

FOXDAL, P.; BERGQUIST, Y.; SJODING, A.; OSTAMN, B. The validity and accuracy of blood lactate measurements for prediction of maximal endurance running capacity. Dependency of analysed blood media in combination with different designs of the exercise test. **Int J Sports Med.**, v.156, p.89-95, 1994.

GOETZ, M.J.; JR COTE, G.L.; ERKENS, R.J.; MARCH, W.F.; MOTAMEDI, M. Application of multivariate technique to Raman spectra for quantification of body chemicals. **IEEE Trans Biomed Eng.**, v.42, p.728-731, 1995.

GOLDING, L.A. Drugs And Hormones. In: Morgan, W.P. **Ergogenic Aids And Muscular Performance.** New York: Academic Press, 1972.

GOODMAN; GILMAN. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** McGraw-Hill, 9th ed. p.221, 1996.

GURLEY, B.J.; GARDNER, S.F.; HUBBARD, M.A. Content versus label claims in ephedra-containing dietary supplements. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v.57,p.963-969, 2000.

GREEN, G.A.; CATLIN, D.H.; STARCEVIC, B. Analysis of over-the-counter dietary supplements. **Clin. J. Sport Med.**, v.11,p.254- 259, 2001.

HAALAND, D.M. **Multivariate calibration. Methods applied to quantitative FT-IR analysis.** New York: Academic Press p. 385, 1990.

HALPERN, A.; MANCINI, M.C. Tratamento farmacológico da obesidade - Drogas termogênicas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.40, p.224-227, 1996.

HAWKS, R.L.; CHIANG, C.N. **Urine Testing for Drugs of Abuse**. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute on Drug Abuse, Research Monograph 73, Rockville, MD, 1986.

HAZEN, K.H. **Glucose determination in biological matrices using near-infrared spectroscopy**. 1995. 315f. [PhD Dissertation]. Iowa City, IA: University of Iowa, 1995.

HEISE, H.M. Non-invasive monitoring of metabolites using near infrared spectroscopy: state of the art. **Horm Metab Res.**, v.28,p.527-534, 1996.

HEISE, H.M.; MARBACH, R.; KOSCHINSKY, T.H.; GRIES, F.A. Noninvasive blood glucose sensors based on near-infrared spectroscopy. **Artif Organs.**, v.18,p.439-447, 1994.

HENDERSON, G.L.; HARKEY, M.R.; ZHOU, C.; JONES, R.T.; JACOB III, P. Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. Dose-response relationships. **J Anal Toxicol.**, v.20, p1-12, 1996.

HIRSCHFELD, T.; CHASE, D.B. FT-Raman spectroscopy: development and justification, **Appl. Spectrosc.**, v.40, p.133, 1986.

IOC Medical Commission. **IOC list of prohibited classes of substances and prohibited methods**. Olympic Movement Antidoping Code, Appendix A, International Olympic Committee, Lausanne. 2003.

JACOBS, I.; PASTERNAK, H.; BELL, D.G. Effects of ephedrine, caffeine, and their combination on muscular endurance. **Med Sci Sports Exerc.**, v.35, n.6, p.987-94, 2003.

JACQUES, S.L. Laser-tissue interactions: photochemical, photothermal and photomechanical, **Surg Clin North Am.**, v.72, p.531-558, 1992.

JAGEMANN, K.; FISCHBACHER, C.; DANZER, K.; MÜLLER, U.A.; MERTES, B. Application of near-infrared spectroscopy for non-invasive determination of blood/tissue glucose using neural networks. **Z Phys Chem.**, v.191,p.179-190, 1995.

KHALIL, O.S. Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements. **Clinical Chemistry.**, v.45,p.165-177, 1999.

KIM, M.; OWEN, H.; CAREY, P. R. **Appl. Spectrosc.**, v.47, p.1780-1783, 1993.

KINDERMANN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur J Appl Physiol.**, v.42, p.25-34, 1979.

KUNST, H. **Transcutaneous, non-bloody determination of the concentration of substances in the blood**. International patent WO95/31928. International application published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), 1995.

LAMBERT, J.; STORRIE-LOMBARDI, M.; BORCHERT, M. Measurement of physiological glucose levels using Raman spectroscopy in a rabbit aqueous humor model. **IEEE-LEOS Newsletter**, v.12, p.19-22, 1998.

LANDSBERG, G.; MANDELSTAM, L. A novel effect of light scattering in crystals, **Naturwissenschaften**, v.16, p.557, 1928.

LASERNA, JAVIER. **An Introduction to Raman Spectroscopy: Introduction and Basic Principles**. Department of Analytical Chemistry. University of Malaga. Spain. 2001. Disponível em <<http://www..spetroscopynow.com.>> Acessado em 10 abr. 2003.

LEHMANN, M.; BERG, A.; KAPP, R.; WESSINGHAGE, T.; KEUL, J. Correlation between laboratory testing and distance running performance in marathoners of similar performance ability. **Int J Sports Med.**, v. 4, p.226-230, 1983.

LIU, Y.L.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A.; STOCK, M.J. Contribution of beta3-adrenoceptor activation to ephedrine-induced thermogenesis in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.19, p.678-85, 1995.

LOMBARDO, J.A. Stimulants And Athletic Performance (Part 1 From 2): Amphetamines And Caffeine. **The Physical And Sportsmedicine.**, v.14, n.11, p.128-42, 1986.

LOMBARDI, D.J.; WANG, C.; SUN, B.; FOUNTAIN, A.W. III, VICKERS, J.J.; MANN, C.K. et al. Quantitative and qualitative analysis of some inorganic compounds by Raman spectroscopy. **Appl Spectrosc.**, v.48, p.875-883, 1994.

LONG, D.A. **Raman Spectroscopy**. New York: McGraw-Hill, 1977. p.1-12.

MADER, A. Evaluation of the endurance performance of marathon runners and theoretical analysis of test results. **J Sports Med.**, v.31, p.1-19, 1991.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby, **Nature**, v.187, p.493, 1960.

MALIN, S.F.; RUCHTI, T.L.; BLANK, T.B.; THENNADIL, S.N.; MONFRE, S.L. The noninvasive measurement of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Clin Chem.**, v.45,p.1651-1658, 1999.

MANCINI, M.C.; HALPERN, A. Tratamento Farmacológico da Obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.46, n.5, p.497-512, 2002.

MARBACH, R.; KOSCHINSKY, T.H.; GRIES, F.A.; HEISE, H.M. Noninvasive blood glucose assay by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of the human inner lip. **Appl Spectrosc.**, v.47,p.875-881, 1999.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: John Wiley and Sons. 1989. 419p.

MARTINDALE, W. **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. 27.ed. The, London: Pharmaceutical Press ,1977.

MCKENZIE, A. L. Physics of thermal processes in laser-tissue interaction. **Phys. Med. Biol.**, v.35, p.1175-1209, 1990.

MENDELSON, Y. Pulse oximetry: theory and applications for noninvasive monitoring. **Clin Chem.**, v.38, p.1602-1607, 1992.

MOTTRAM, D. R. **Drugs In Sport**. Human Kinetics, 1988

NAGLE, F.D.; ROBINHOLD, D.; HOWLEY, E.; DANIELS, J.; BAPTISTA, G.; STOEDDEFALKE, K. Lactic acid accumulation during running submaximal aerobic demands. **Med Sci Sports.**, v.2, p.182-186, 1970.

OWEN, H. Phase Holographic Optical Elements. In: CHALMERS, J.M.; GRIFFITHS, P.R., (Ed.) **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, Theory and Instrumentation. Chichester: Wiley: 2002. v.1, p.482–489.

PACHECO, M.T.T. INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO. **Ótica aplicada**. São José dos Campos: Univap, 1999. 129 p.

PAGNANI, A.; OLIVEIRA, O.; SANTONJA, R. **Manual Prático de Controle Antidoping**. Associação Brasileira de Estudo e Combate ao Doping. 2002. Disponível em: < <http://www.antidoping.com.br> >. Acessado em 05 fev. 2004.

PASQUALI, R.; CESARI, M.P.; MELCHIONDA, N.; STEFANINI, C.; RAITANO, A.; LABO, G. Does ephedrine promote weight loss in low-energy adapted obese women? **Int J Obes.**, v.11, p. 163-8, 1987.

PILOTTO, S.; PACHECO, MTT.; SILVEIRA, L. JR.; VILLAVARDE, A.B., ZANGARO, R.A. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. **Lasers Med Sci.**, v.16, n.1,p.2-9, 2001.

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. The optical analog of the Compton effect, **Nature**, v.121, p.711, 1928.

ROBINSON, M.R.; EATON, R.P.; HAALAND, D.M.; KOEPP, G.W.; THOMAS, E.V.; STALLARD, B.R.; ROBINSON, R.L. Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation. **Clin Chem.**, v.38,p.1618-1622, 1999.

RUNDELL, KW. Treadmill roller ski test predicts biathlon roller ski race results of elite U.S. biathlon women. **Med Sci Sports Exerc.**, v.27, p.1677-1685, 1995.

SAIDI, I.S.; JACQUES, S.L.; TITTEL, F.K. Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonate skin. **Appl Opt.**, v.34, p.7410-7418, 1995.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo : Ed. UNESP. 1996. p.13-15.

SHAW, A.D.; KADERBHAI, N.; JONES, A.; WOODWARD, A.M.; GOODACRE, R.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B. Noninvasive, On-Line Monitoring of the Biotransformation by Yeast of Glucose to Ethanol Using Dispersive Raman Spectroscopy and Chemometrics. **Appl Spectrosc.**, v.53. n.11, p.1419-1428, 1999.

SILVEIRA, L. JR.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; CHAVANTES, M. C.; PASQUALUCCI, C. A. G. Near-Infrared Raman Spectroscopy of Human Coronary Arteries: Histopathological Classification Based on Mahalanobis Distance. **Lasers Surg. Med.**, v.21, n.4, p. 203-208, 2003.

SJODIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int J Sports Med.**, v.2, p.23-26, 1981.

SMEKAL, A. The quantum theory of dispersion, **Naturwissenschaften**, v.11,p.873, 1923.

STEFFES, P.G. Laser-based measurement of glucose in the ocular aqueous humor: An efficacious portal for determination of serum glucose levels. **Diabetes Technol Ther.**, v.1,p.129-133, 1999.

TANAKA, K.; PACHECO, M.T.T.; BRENNAN, J.F. III; ITZKAN, I.; BERGER, A.J.; DASARI, R.R.; FELD, M.S. Compound parabolic concentrator probe for efficient light collection in spectroscopy of biological tissues. **Appl Opt.**, v.35,p.758-763, 1996.

TARR, R.V. **The Non-Invasive Measure of D-Glucose in the Ocular Aqueous Humor Using Stimulated Raman Spectroscopy**. 1991. Thesis (Doctoral) - Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, 1991.

TARR, R.V.; TARR, P.G.S. inventors. Non-invasive blood glucose measurement system and method using simulated Raman spectroscopy. **US patent.**, v.5, n.243, p.983, 1993.

TEDESCO, J.M.; OWEN, H.; PALLISTER, D.M.; MORRIS, M.D. Principles and Spectroscopic Applications of Volume Holographic Optics. **Analytical Chemistry**, v.65, n.9, p. 441A, 1993.

TRACHTA, G.; SCHWARZE, B.; SÄGMÜLLER, B.; BREHM, G.; SCHNEIDER, S. Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine. **Journal of Molecular Structure**. v.693, p.175-85, 2004.

TSENG, Y.L.; HSU, H.R.; KUO, F.H.; SHIEH, M.H.; CHANG, C.F. Ephedrine in over-the-counter cold medicines and urine specimens collected during sport competitions. **J Anal Toxicol.**, v.27, n.6, p.359-65, 2003.

VAN GEMERT, M.J.C.; JACQUES, S.L.; STERENBORG, H.J.CM.; STAR. W.M. Skin optics. **IEEE Trans Biomed Eng.**, v.36, p.1146-1154, 1989.

VICKERS, T.J.; MANN, C.K. **Quantitative analysis by Raman spectroscopy**. Garassili JG Bulkin BJ eds. Analytical Raman spectroscopy. New York: Wiley,1991. p.107-135.

WANG, S.Y.; HASTY, C.E.; WATSON, P.A.; WICKSTEAD, J.P.; STITH, R.D.; MARCH, W.F. Analysis of metabolites in aqueous solutions by using laser Raman spectroscopy. **Appl. Opt.**, v.32, p.925-929, 1993.

WICKSTED, J.P.; ERKENS, R.J.; MOTAMEDI, M.; MARCH, W.F. Monitoring of aqueous humor metabolites using Raman spectroscopy. **SPIE Proc** n.2135, p.264-274, 1994.

WICKSTED, J.P., ERKENS, R.J.; MOTAMEDI, M.; MARCH, W.F. Raman spectroscopy studies of metabolic concentrations in aqueous solutions and in aqueous humor species. **Appl Spectrosc.**, v 49, p.987-993, 1995.

WILSON, B.; JACQUES, S.L. Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. **IEEE J Quant Electron.**, v.26,p.2186-2199, 1990.

WOLLMAN, S.T.; BOHN, P.W. Evaluation Of Polynomial Fitting Functions For Use With CCD Arrays In Raman Spectroscopy. **Appl Spectrosc.** v.47, n.1, p.125-6, 1993.

XU, J.; FORD, J.F.; MANN, C.K.; VICKERS, T.J.; BRACKETT, J.M.; COUSINEAU, K.L.; ROBEY, W.G. Raman measurements in bioreactor materials. **SPIE Proc.**, n.2976, p.10-19, 1997.

YANG, S.Y.; HASTY, C.E.; WATSON, P.A.; WICKSTED, J.P.; SMITH, R.D.; MARCH, W.F. Analysis of metabolites in aqueous solutions by using laser Raman spectroscopy. **Appl Opt.**, v.32, p.925-929, 1993.

YESALIS, C.; COWART, V. **The Steroids Game-Na Expert'S Inside At Anabolic Steroid Use In Sports.** Human Kinetics, 1988.

8 Anexo I

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L169/2004/CEP, sobre “*Utilização de espectroscopia Raman (NIRS) para detecção e quantificação de efedrina em urina*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Tadeu T. Pacheco, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979), sendo considerado **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 25 de novembro de 2004



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap