



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE MARINGÁ**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

---

**LIDIANE VIZIOLI DE CASTRO**

**ESTUDO DE LESÃO DE CÁRIE  
EXPERIMENTAL VIA ESPECTROSCOPIA  
FOTOACÚSTICA E RAMAN**

**Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá para a  
obtenção do título de mestre em Física.

---

Maringá  
2015

**LIDIANE VIZIOLI DE CASTRO**

**ESTUDO DE LESÃO DE CÁRIE  
EXPERIMENTAL VIA ESPECTROSCOPIA  
FOTOACÚSTICA E RAMAN**

**Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá para a  
obtenção do título de mestre em Física.

Maringá  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C355e Castro, Lidiane Vizioli de  
Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e raman / Lidiane Vizioli de Castro. -- Maringá, 2015.  
78 f. : il. color., figs., tabs., anexo

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francielle Sato.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em física, 2015.

1. Espectroscopia Fotoacústica. 2. Espectroscopia Raman. 3. Cárie Dentária. 4. Fotossensibilizadores. I. Sato, Francielle, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em física. III. Título.

CDD 21.ed. 535.843

MN-003124

**LIDIANE VIZIOLI DE CASTRO**

**ESTUDO DE LESÃO DE CÁRIE  
EXPERIMENTAL VIA ESPECTROSCOPIA  
FOTOACÚSTICA E RAMAN**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá para a  
obtenção do título de mestre em Física.

**Banca Examinadora**

---

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato

---

Examinadora - Profa. Dra. Mitsue Fujimaki

---

Examinadora - Profa. Dra. Elizandra Sehn

Maringá  
2015

## Dedicatória

Dedico aos meus pais Sebastião “*in memoriam*”,  
e Lucileni.

## Agradecimentos

Este trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, em especial, quero agradecer:

À **Deus**, por abrir meus caminhos para mais uma conquista.

As minhas irmãs, **Cristiane e Marilaini**, que se preocuparam, torceram e rezaram para que tudo corresse bem nessa jornada e esse dia se tornasse realidade. E ao meu cunhado **Eduardo** por todo incentivo, amizade e companheirismo.

Ao **Henrique**, meu namorado. Por estar ao meu lado nessa reta final, me apoiando com tanto carinho e paciência. Hoje sou uma pessoa mais feliz por ter você ao meu lado. Que esta seja a primeira de muitas vitórias que compartilharemos juntos.

À **Francielle Sato**, não existem palavras para lhe repassar o carinho e admiração como professora e amiga que tenho em relação a sua pessoa. Muito obrigada por tudo, principalmente por sua confiança e apoio.

Ao **Professor Mauro**, pela ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

À **Ingrid**, por ser minha companheira de pesquisa, pelas conversas produtivas, pelas risadas e pelo apoio durante os experimentos. Não foi fácil passar tantas horas dentro do laboratório, mas valeu a pena.

À **Ana Claudia**, pela amizade e paciência em me ajudar nos meus primeiros passos na fotoacústica.

Aos amigos da minha turma de mestrado. **A Glécilla** pelo seu otimismo e suas palavras amigas. **Ao Julio** por todo apoio e amizade, por ser meu grande amigo de todas as horas. **Ao Leandro e Luiz Gustavo** pela ajuda nas disciplinas. **Ao Maíke** meu grande amigo laureado, por quem eu tenho uma grande admiração. **Ao Otávio** pelo incentivo constante durante todas as dificuldades e alegrias dessa trajetória. A agradável convivência com vocês fizeram do curso um tempo inesquecível. Sem eles a caminhada teria sido bem mais difícil!

Aos meus grandes amigos, pela amizade acima de tudo, **Fernando e Juliana** pelos tantos momentos que dividimos ansiedades, expectativas, experiências e alegrias, que tornam difícil transcrever para poucas linhas o valor da amizade de vocês.

Ao **André**, pelo seu enorme coração e amizade. Suas palavras amigas sempre me fizeram acreditar no meu potencial.

A todos os **meus familiares e amigos**, por todo carinho e por me mostrarem que acreditar nos sonhos é o segredo para e se transformarem em realidade.

Aos **amigos do GEF**, que tornam meus dias mais agradáveis e divertidos.

A todos os **professores do departamento de Física** da Universidade Estadual de Maringá, que foram fundamentais na minha formação.

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, em especial à **Professora Mitsue e a Ingrid**, pela confecção das amostras e parceria neste estudo.

A **Universidade Estadual de Maringá e a CAPES** pelo apoio financeiro concedido.

E a todos os demais que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que esse dia chegasse.

*Muito obrigada à todos!*

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Fundamentação Teórica</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. Estrutura da Dentina</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.1. Interação da Luz com o Tecido Dentário</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. A Cárie de Dentina</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3. Espectroscopia Fotoacústica</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.1. Breve Histórico</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.2. O Efeito Fotoacústico</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.3. Mecanismos de Geração do Sinal Fotoacústico</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.4. Comportamento Óptico e Térmico da Amostra</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.5. Classificação Térmica da Amostra</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.6. A Célula Fotoacústica Fechada</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3.7. Método de Separação dos Espectros na Fase do Sinal Fotoacústico</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4. Espalhamento Raman</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4.1. Vibrações Moleculares</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.2. Espectroscopia Raman</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4.3. Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)</b> .....	<b>38</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1. Sinal Fotoacústico</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2. Espectroscopia FT-Raman</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3. Amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.1. Preparação das Amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.2. Indução de Cárie</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.3. Aplicação do Fotossensibilizador</b> .....	<b>46</b>
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1. Estudo da Lesão de Cárie Experimental via Espectroscopia Fotoacústica</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2. Estudo da Lesão de Cárie Induzida via Espectroscopia Raman</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3. Estudo da Permeação de Fotossensibilizador em Dentina com Lesão de Cárie Induzida</b> .....	<b>61</b>
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>69</b>

## Resumo

A cárie dentária é um processo químico-parasitário, no qual as bactérias presentes na cavidade bucal metabolizam açúcares da dieta e produzem ácidos fracos que desmineralizam os tecidos dentais. Os principais métodos utilizados em clínica para a detecção de lesões de cárie por cirurgiões dentistas são basicamente exames clínicos visual-tátil e radiográficos. A busca por métodos de detecção da lesão de cárie precoce visa a ampliação da confiabilidade do diagnóstico e proporcionar a preservação do tecido natural no tratamento. Nesse aspecto, métodos espectroscópicos podem ser utilizados para detecção e análise do processo da cárie dental, com a possibilidade de se obter informações sobre as mudanças estruturais dos tecidos cariados. Este trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro*, por meio das espectroscopias fotoacústica (regiões espectrais do ultravioleta e do visível) e Raman (infravermelho médio), mudanças estruturais e moleculares da dentina cariada experimentalmente em comparação com a dentina hígida. Os resultados mostraram que a espectroscopia fotoacústica permitiu detectar a ocorrência da desmineralização no processo inicial da cárie de dentina com lesão de cárie induzida, com maior exposição da matriz orgânica, que é majoritariamente composta por colágeno. O mesmo comportamento foi observado na diferença de fase entre as bandas atribuídas ao colágeno e a porfirina, proteínas encontradas na dentina, evidenciando também a exposição da matriz orgânica na dentina com lesão de cárie induzida. A espectroscopia Raman foi empregada para estudar possíveis mudanças estruturais no colágeno da dentina. Os resultados também indicaram desmineralização da dentina cariada, monitorada pela redução do pico Raman atribuído ao grupamento fosfato dos cristais de hidroxiapatita da porção mineral da dentina. A técnica mostrou ainda que o colágeno não atingiu processos de desnaturação, comuns em cáries de estágio avançado. Isto foi feito a partir da análise da razão da ligação cruzada na qual avalia-se a razão entre as bandas de 1660 e 1690  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas à amida I. Além da desmineralização, a espectroscopia Raman também mostrou exposição da matriz orgânica a partir das bandas de colágeno, observando-se aumento da área da banda correlacionada com a amida I, da mesma forma como mostrado nos resultados da espectroscopia fotoacústica. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que em estágios iniciais da lesão de cárie em dentina foi possível caracterizar a desmineralização e aumento da exposição da matriz orgânica, mostrando que as técnicas de espectroscopia fotoacústica e Raman são promissoras para o estudo *in vitro* do estágio inicial da cárie dentinária.

**Palavras chave:** Cárie dentária, espectroscopia fotoacústica e Raman.

## Abstract

Dental caries are chemical-parasitic, in which the bacteria present in the oral cavity metabolize dietary sugars and produce weak acids which demineralize the dental tissues. The standard methods used by dental surgeons for detection and treatment of caries are visual inspection and radiographic examinations. The researches for new caries detection methods aims to increase the reliability of diagnosis. The caries detection method should present some features such as the ability to detect caries at an early stage. In this point of view spectroscopic methods can be used for detection and analysis of dental caries process, allowing to obtain information about the structural changes presented by the infected tissues. This study aims to evaluate *in vitro*, through photoacoustic spectroscopy (in the visible-ultraviolet regions) and Raman spectroscopy (medium infrared region), structural and molecular changes of carious dentin compared to sound dentin. The results obtained by means of photoacoustic spectroscopy analysis indicate demineralization in dentin caries induced with greater exposure of the organic matrix mainly composed of collagen. The photoacoustic phase resolved method in collagen bands showed initial process of demineralization of tooth tissue analyzed, because the phase of the signal in collagen band centered at 325 nm showed a decrease for the dentin with induced caries when compared to sound dentin. The same behavior was observed in the phase difference between the bands attributed to the collagen and the porphyrin, proteins found in dentin, showing the exposure of the organic matrix in dentin with induced caries. Raman spectroscopy was used to study possible structural changes in dentin collagen and the results also indicated demineralization of dentin, monitored by reducing the peak Raman attributed to phosphate group, which is a component of the hydroxyapatite crystals in the mineral portion of the dentin. The technique also indicates that the collagen denaturation has not occurred, a common process in advanced caries that can be analyzed evaluating the cross linked bond through the variation of the ratio between the bands at 1660 and 1690  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to amide I. In addition to the demineralization, Raman spectroscopy also showed exposure of the organic matrix, the collagen bands, observed by the increase in the band area correlated to amide I, according to the results obtained with the photoacoustic spectroscopy. The results obtained in this work showed that the initial stages of dentin caries lesion was possible feature a demineralization and increased exposure of organic matrix, showing that the photoacoustic and Raman spectroscopies are promising for *in vitro* study of dental caries in initial stages.

**Keywords:** Dental caries, photoacoustic and Raman spectroscopy.

## 1. Introdução

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, em que as diferenças entre níveis de energia, do átomo ou molécula, são expressos na forma de espectros. Para as moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Geralmente, as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas ou também no infravermelho longínquo. As diferentes regiões espectrais exigem espectrômetros com elementos dispersivos e sensores adequados, dessa maneira é possível ter uma gama de espectroscopias para as diferentes regiões do espectro da radiação eletromagnética [1].

Como cada comprimento de onda da radiação significa uma determinada quantidade de energia que ela transporta, ao interagir com a matéria, cada um deles pode induzir uma determinada interação. A análise das interações pode ser utilizada para caracterizar o material em estudo, fornecendo informações a respeito da estrutura molecular (simetria molecular, distância e ângulos das ligações) e das propriedades químicas (distribuição eletrônica, alongação das ligações, processos intra e intermoleculares) [1].

Métodos espectroscópicos vêm sendo cada vez mais aplicados para diagnósticos em tecidos biológicos, como por exemplo em tecidos dentários [2 - 6], pois, geralmente, necessitam de pouco preparo do material e em geral são baseados em técnicas não destrutivas. O diagnóstico de doenças bucais, tais como a cárie dentária, é de grande interesse para a área da odontologia [7].

Além da preocupação com a estética, passou-se a ter interesse nas patologias relacionadas a estrutura dental, pois a cada ano o número de incidência de cárie e outras doenças bucais aumenta [8]. A cárie dental é a doença mais comum da infância, chegando a afetar mais de 50% das crianças [9], e é classificada como uma doença crônica dos tecidos dentários duros, que engloba um processo dinâmico de desmineralização e remineralização causada por bactérias, resultando na destruição da fase orgânica da dentina [10]. As consequentes lesões cáries são produzidas pelos produtos metabólicos finais de natureza ácida, decorrentes da ação de bactérias capazes de fermentar os carboidratos, basicamente açúcares [10, 11]. Seu tratamento envolve a remoção de tecido cariado com preservação máxima de tecido que permita a vitalidade do dente e/ou longevidade da restauração [12].

Atualmente procura-se procedimentos de preparo cavitário que preservem o máximo a estrutura dentária, visto que, nenhum material reparador substitui o tecido dentário. Assim, o tratamento baseado na aplicação de agentes com propriedades bactericidas, aplicável à dentina infectada, favorece a preservação do dente restaurado [1, 9, 12]. A terapia fotodinâmica (PTD) esta entre as inovações para o tratamento de carie, uma vez que consiste basicamente no uso de um agente fotossensibilizador (FS) associado a uma fonte de luz, com comprimento de onda específico, que resulta na inativação de microrganismos por meio de reações fotoquímicas. A eritrosina é um corante que se enquadra nas características necessárias para ser um bom fotossensibilizador, é utilizado como corante biológico e na produção de produtos corantes da placa bacteriana em dentes [1, 9, 12, 13].

Tendo em vista a procura por novos métodos que complementem a avaliação e diagnóstico de patologias feitas por técnicas convencionais, ou até mesmo a substituição destas para melhor revelar os mecanismos físico - químicos envolvidos, o Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos (GEFF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) vem atuando no emprego de técnicas espectroscópicas para avaliação de tecidos biológicos. Recentemente foram realizados estudos em parceria com o Departamento de Odontologia da UEM sobre a aplicação da espectroscopia fotoacústica para análises na dentina humana, entre elas as propriedades de permeação de fotossensibilizadores na dentina visando aplicação em terapia fotodinâmica. Estes estudos estão descritos nas dissertações de mestrado de Juliana Nagata [13], Ariane Ximenes [12], Ana Cláudia Nogueira [1] e Ingrid Gomes Perez Occhi [9]. Outros ensaios nessa área têm sido realizados visando o estudo das interações químicas entre os tecidos dentários com adesivos e clareadores [14 - 17]. Para alguns destes estudos, técnicas espectroscópicas na região do infravermelho também têm sido usadas, tais como a espectroscopia Raman. A espectroscopia Raman permite caracterizar tecidos dentários saudáveis e alterados, por meio de estudos dos modos vibracionais de cada molécula relacionada ao tecido, permitindo assim avaliar possíveis alterações moleculares devido à processos infecciosos, como é o caso da cárie dentária.

Para se entender a dinâmica desses processos que afetam a saúde bucal é necessário saber a estrutura e composição química dos elementos que constituem o dente e as regiões mais afetadas do mesmo. Os métodos espectroscópicos tanto na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) bem como na região do infravermelho médio (IFM) têm se mostrado promissores para se realizar estes estudos relacionados as estruturas dentárias [9, 12 - 15]. Dentre as técnicas espectroscópicas na região espectral do UV-Vis, a espectroscopia

fotoacústica é um método que ao invés de medir a radiação transmitida ou refletida pela amostra, como ocorre para as técnicas convencionais de espectroscopia no UV-Vis, determina a fração da energia luminosa que é absorvida e transformada em calor. Ou seja, amostras opacas e semi sólidas que espalham luz podem ser estudadas com esta técnica.

A espectroscopia Raman é uma técnica que pode fornecer informação sobre a estrutura química de compostos orgânicos ou inorgânicos, permitindo assim sua caracterização. A técnica baseia-se na interação de uma radiação de determinada frequência, que ao ser espalhada após incidir no material estudado, tem uma pequena porção espalhada inelasticamente, ou seja, com frequência ou comprimento de onda diferente da radiação incidente, revelando informações sobre a composição molecular do material analisado. Este espalhamento é conhecido como Raman.

As metodologias convencionais, visuais - táteis, para o diagnóstico da cárie dentinária em consultório odontológico permitem detectar a presença da cavitação da lesão de cárie. As técnicas espectroscópicas poderiam permitir a determinação da desmineralização precoce, principalmente na dentina, tecido dentário que conecta a parte mais externa do dente (esmalte) com a vascularizada (polpa) do órgão. Nesse viés, o objetivo principal deste trabalho é estudar as possíveis mudanças estruturais na dentina com lesão de cárie experimental, utilizando as espectroscopias fotoacústica e Raman, e analisar a permeação do fotossensibilizador (eritrosina), utilizado no tratamento da cárie, em dentina cariada. A metodologia de cárie experimental foi adotada porque a cárie dentinária não induzida é de difícil controle experimental devido à variabilidade biológica de indivíduo para indivíduo.

Esta dissertação foi desenvolvida em 5 capítulos. Primeiro capítulo sendo esta introdução. Segundo capítulo uma breve revisão na literatura abordando a cárie e estrutura da dentina, além da relação da anatomia do dente e sua interação com a luz, e as técnicas espectroscópicas utilizadas neste estudo. Terceiro capítulo foram descritos os materiais e métodos utilizados nessa pesquisa. Quarto capítulo foram feitas as análises e discussões dos resultados. E por fim, uma breve conclusão.

## **1.1. Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar *in vitro*, por meio das espectroscopias fotoacústica e Raman, as mudanças estruturais e moleculares da dentina cariada em comparação com a dentina hígida.

**Objetivos Específicos:**

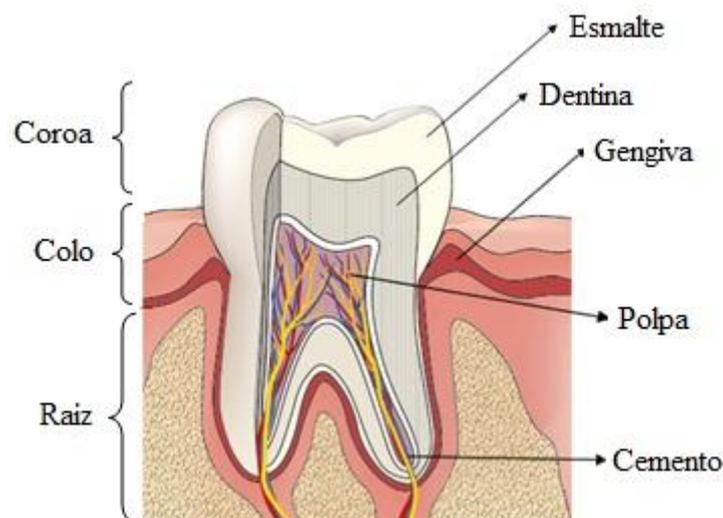
- Análise da desmineralização da dentina cariada a partir dos espectros obtidos pela espectroscopia fotoacústica e Raman;
- Análise da separação de fase entre picos do colágeno e porfirina obtidos via espectroscopia fotoacústica;
- Análise das mudanças conformacionais na dentina cariada a partir de espectros Raman;
- Avaliação do perfil de permeação do fotossensibilizador eritrosina via espectroscopia fotoacústica.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. Estrutura da Dentina

Os dentes são órgãos que apresentam em sua constituição alto teor mineral, sendo em sua maioria sais orgânicos, garantindo sua estrutura rígida e resistente. A coloração natural é branco-amarelada devido à presença de dois tecidos dentários: esmalte e dentina. Considerando o dente iluminado por uma luz branca, o aspecto branco do dente é devido ao esmalte, pois este tecido é mais espalhador em comprimentos de onda menores, da ordem de 350 a 420 nm, e a dentina garante o aspecto amarelado, transmitindo mais luz na região de 500 a 600 nm. O maior espalhamento da luz no esmalte é consequência da presença de cristais de hidroxiapatita, já na dentina a matriz orgânica, principalmente o colágeno, mais abundante do que os cristais promovem a cor amarelada [1].

Os dentes apresentam uma estrutura não homogênea, formada principalmente por esmalte, dentina e polpa (Fig. 1). O esmalte é a camada mais externa da superfície do dente, e é o tecido mais mineralizado e duro do corpo humano. A polpa situa-se no centro do dente, é um tecido mole onde se encontram nervos e vasos sanguíneos. A dentina é a camada abaixo do esmalte e que forma o corpo do dente [18].



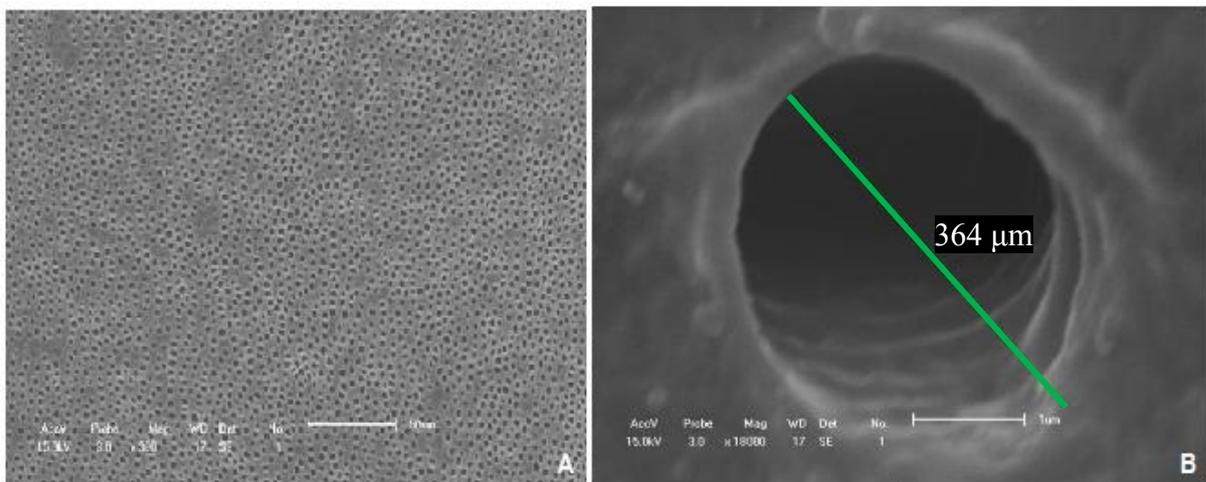
**Figura 1:** Anatomia do dente [19].

Na porção coronária a dentina é recoberta pelo esmalte, já na porção radicular ela é recoberta pelo cimento. A cavidade pulpar é delimitada pela superfície interna da dentina e

é onde a polpa dentária se aloja. Como trata-se de um tecido vivo, possui prolongamentos de células especializadas e substância intercelular [10].

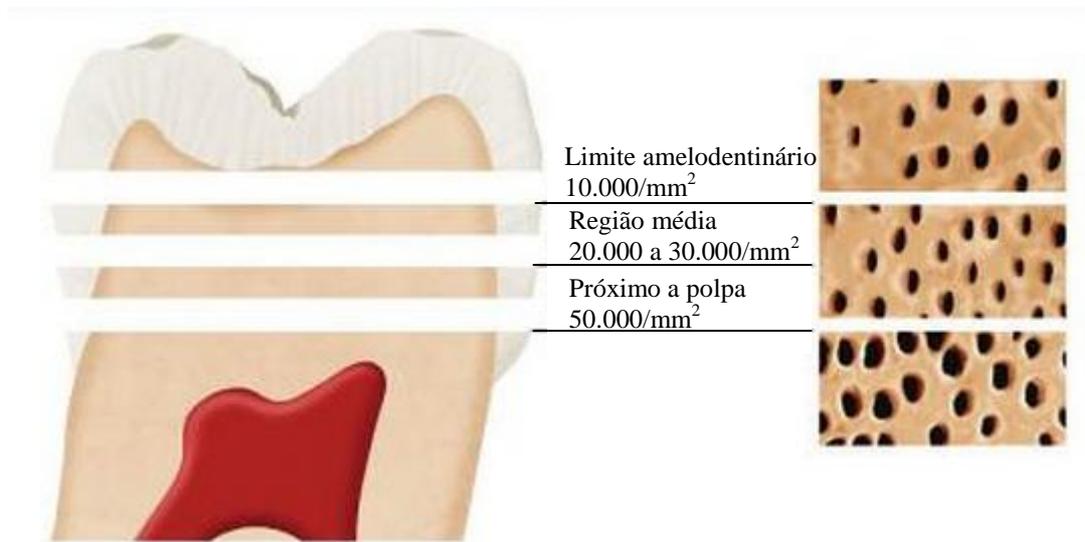
A dentina é constituída basicamente por 70% de conteúdo mineral, 20% de matéria orgânica e 10% de água, em peso [10, 12]. Em volume, essas frações representam aproximadamente 25% em volume de água, 30% em volume de matriz orgânica (92% de fibrilas de colágeno do tipo I) e 45% de conteúdo mineral (composta principalmente por cristais de hidroxiapatita) [20]. Sendo este tecido menos mineralizado e com mais conteúdo orgânico que o esmalte dentário.

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que não apresenta células em seu interior, apenas os prolongamentos dos odontoblastos estão dentro dos túbulos, ou também chamados canalículos, (Fig. 2) que percorrem desde a polpa até a proximidade da junção amelodentinária, formando o corpo do dente [21].



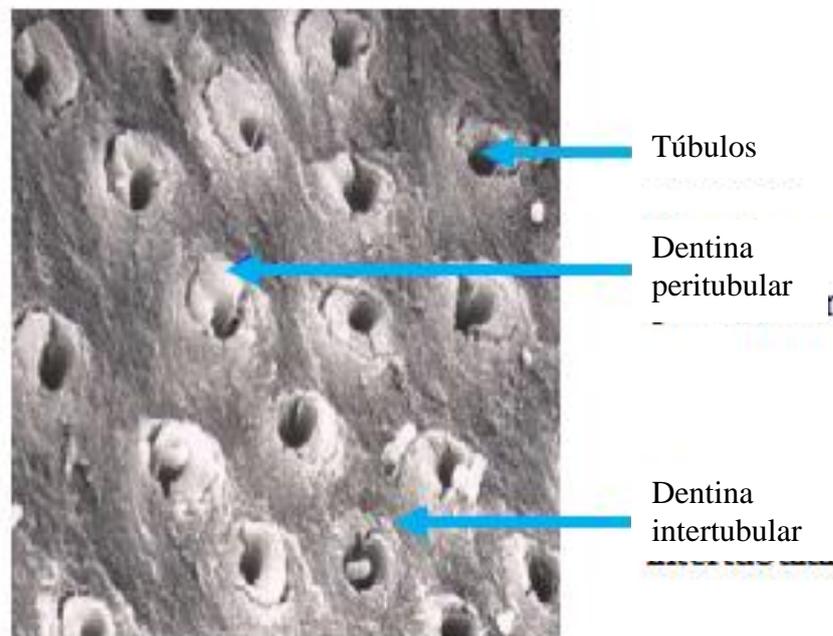
**Figura 2:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da dentina hígida. (A) corte transversal com aumento de 300 vezes; (B) corte transversal com aumento de 18000 vezes [12].

Os canalículos variam de diâmetro (Fig. 3) à medida que se aproximam da superfície pulpar, onde podem atingir até 3  $\mu\text{m}$ . Suas paredes são limitadas por uma dentina pericanalicular, também chamada de peritubular, hipermineralizada ao longo de seu comprimento, exceto na parte do canalículo próximo da polpa [22].



**Figura 3:** Densidade tubular *versus* proximidade do órgão pulpar. Quanto maior o número e o diâmetro dos túbulos dentinários e, conseqüentemente, maior a permeabilidade do respectivo tecido [23].

A região de dentina entre os canalículos é muito rica em matriz orgânica, colágeno e substâncias de natureza glicoproteicas, e é menos calcificada do que a dentina peritubular, as quais são denominadas de dentina intertubular (Fig 4) [22]. É importante destacar que a composição da dentina varia de acordo com a idade do dente, devido à sua mineralização progressiva, mesmo que já esteja totalmente formado.



**Figura 4:** Regiões da dentina [24].

### 2.1.1. Interação da Luz com o Tecido Dentário

Existe uma relação entre a luz incidente e o seu grau de penetração em razão da estrutura molecular do dente. Quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior será o seu grau de penetração, lembrando que uma radiação de comprimento de onda menor sofrerá maior espalhamento [12], o que garante o aspecto branco ao esmalte.

Durante a interação entre a luz e o tecido dental podem ocorrer diferentes mecanismos, tais como, absorção, transmissão, reflexão, espalhamento e luminescência, dependendo do comprimento de onda da luz incidente [18].

O grau de interação, na maioria dos casos, é proporcional a absorção de luz pelo tecido, a extensão destes processos são dependentes da estrutura do dente, ou seja, estão relacionados ao coeficiente de absorção do conteúdo de água, hemoglobina, esmalte, hidroxiapatita entre outros elementos presente [18].

De modo geral, os tecidos biológicos são constituídos por uma mistura muito complexa de moléculas. Várias dessas moléculas são emissoras de luminescência, quando excitadas com um comprimento de onda adequado [18]. A tabela 1 mostra valores máximos de excitação e emissão de alguns compostos orgânicos e inorgânicos do tecido dentinário e de bactérias que causam a cárie dental.

**Tabela 1:** Valores máximos de emissão e excitação de alguns compostos orgânicos do tecido dentinário e de bactérias que causam a cárie dental [25].

<b>Composto (orgânico e inorgânico)</b>	<b>Excitação Máxima (nm)</b>	<b>Emissão Máxima (nm)</b>
<b>Estrutura dentária (Esmalte)</b>	337, 375	430 - 450, 480 - 500, 460, 560
<b>Bactéria da cárie dental</b>	320 - 380, 407, 360 - 580, 655	590 - 650, 635, 600 - 700, 720 - 800
<b>Porfirina (Esmalte/Dentina)</b>	405, 407, 400 - 450, 630	590, 610, 620, 635, 675, 690, 705
<b>Cálculo supra e subgingival</b>	420	595, 635, 650, 695
<b>Aminoácidos (Esmalte/Dentina)</b>		
<b>Triptofano</b>	280, 295	350, 340 - 350, 345
<b>Tirosina</b>	275	300, 340
<b>Fenilalanina</b>	260	280
<b>Proteínas estruturais (Dentina)</b>		
<b>Colágeno</b>	270, 325, 330, 335	380, 390 - 405, 395, 400, 405

<b>Colágeno (ligações cruzadas)</b>	370	460 - 490
<b>Elastina</b>	290, 325, 350, 360	340, 400, 420, 460
<b>Elastina (ligações cruzadas)</b>	390 - 420, 400, 420 - 460	500, 500 - 540
<b>Coenzimas (Esmalte/Dentina)</b>		
<b>FAD, Flavina</b>	430, 450	515, 535, 550
<b>NADH</b>	290, 340, 350, 365	440, 450, 455, 460
<b>NADPH</b>	336	464
<b>Lipídios (Esmalte/Dentina)</b>		
<b>Fosfolipídios</b>	436	540, 560
<b>Lipofuscina</b>	340 - 395	430 - 460, 540
<b>Cerídeo</b>	340 - 395	430 - 460, 540

Os compostos orgânicos que desempenham papel importante nos processos de cárie são as proteínas estruturais como o colágeno e porfirinas, e bactérias. Colágeno e porfirina são proteínas abundantes em tecidos conjuntivos, dentes e ossos [18, 25].

## 2.2. A Cárie de Dentina

O hábito de consumir carboidratos fermentáveis pode gerar contínuas quedas de pH, atribuindo um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano (comunidade composta de uma ou mais espécies de bactérias vivendo em um ambiente físico definido) e assim maior produção de ácido [1]. Isto induz a ocorrência de desmineralização do dente, deixando a superfície dentária mais susceptível ao aparecimento de lesões de cárie, ou seja, a cárie pode ser definida como uma destruição localizada dos tecidos dentais causada pela ação dos ácidos produzidos pelas bactérias [12]. Com a desmineralização do esmalte, lentamente a lesão avança na direção da dentina, que torna-se desmineralizada e infectada com bactérias [1, 12].

A cárie de dentina está relacionada a fatores enzimáticos resultantes das enzimas humanas, da família das metaloproteínas (proteína que contém um ou mais íons metálicos como cofatores), várias matrizes de proteínas são degradadas por elas, incluindo diferentes formas de colágeno (colagenase). As metaloproteínases são enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular e que apresentam funções importantes em diversos processos biológicos para o funcionamento do corpo humano. Entretanto, estão envolvidas na progressão de algumas doenças como por exemplo, a cárie, sendo as fibras colágenas o componente mais atacado no processo de cárie da dentina, após sua desmineralização pelos ácidos bacterianos.

A degradação das matrizes de proteínas provoca alterações na estrutura da dentina, essas alterações também interferem em sua permeabilidade. A permeabilidade da dentina está relacionada à característica que esta possui de permitir a passagem, principalmente de fluidos, íons, bactérias e pequenas partículas. Existem diversos fatores que dificultam essa “passagem”, abrangendo até a área exposta (esmalte), a estrutura, a composição química e a espessura do tecido envolvido e a pressão exercida durante o processo. Outro fator importante nesse processo de permeação é o tamanho da partícula, juntamente com a presença de interações químicas entre dentina e o agente penetrante.

Estudos relatam diversas técnicas para facilitar o diagnóstico da cárie, como espectroscopia Raman com laser de diodo, espectroscopia por transmitância na região do infravermelho próximo, imagem digital por fibra óptica, fluorescência, termografia infravermelha, tomografia por coerência óptica, entre outras [26 - 34], que são utilizadas para complementação ou confirmação de forma mais precisa dos métodos convencionais que utilizam inspeção visual e/ou tátil por profissionais especializados.

A espectroscopia de refletância difusa também é empregada para estudar a cárie dentária [35 - 37]. É uma técnica óptica quantitativa, considerada um método simples para compreender as características do tecido [38 - 40]. Uzunov e colaboradores [37], usando esta técnica, observaram que iluminando o dente cariado com luz na região entre 450 - 900 nm, ocorre uma redução significativa na intensidade de refletância espectral. Borisova e colaboradores [41], observaram uma diminuição significativa na intensidade da luz refletida entre dentes com lesões de cárie e dentes não cariados na região azul. Fusayama [42], utilizando microscopia eletrônica de varredura, descreveu em seu trabalho as características da dentina desmineralizada através do processo de cárie, mostrando a formação de camadas distintas. A camada mais externa da dentina cariada é caracterizada pela desmineralização da dentina intertubular, possui cristais escassos e granulados e, poucas fibras de colágeno. Com a ausência da dentina intertubular esse espaço é preenchido por bactérias ou cristais de formas variadas que são distribuídos frouxamente. A camada mais interna, a qual ocorre uma menor desmineralização, as características são similares a da dentina hígida, ou seja, possui mais cristais de apatita unidos a fibras colágenas, mostrando a estriação característica do colágeno. Nakornchai e colaboradores [43], em seu trabalho, caracterizou bioquimicamente o colágeno, principal componente da matriz da dentina, mostrou que a camada externa da dentina cariada sofre alterações significativas. Pinheiro e colaboradores [44], por meio de avaliação histológica, mostrou que o percentual de colágeno é menor em dentina cariada, comparada a

dentina hígida. Ehardt e colaboradores [45], utilizou microscopia eletrônica de varredura, mostrando em seu estudo características específicas de dentes cariados. A dentina intertubular sadia tem um grau de porosidade menor comparada a dentina cariada, isto está relacionado a perda mineral que ocorre no processo de cárie. A dentina cariada é desmineralizada, o que a torna mais amolecida.

Procedimentos de preparo cavitário que preservem o máximo a estrutura dentária são procurados, visto que, nenhum material reparador substitui o tecido dentário. Assim, o tratamento baseado na aplicação de agentes com propriedades antimicrobianas, aplicável à dentina infectada, favorece a preservação do dente restaurado [1, 12, 13]. A terapia fotodinâmica (TFD) está entre as inovações para o tratamento de cárie, uma vez que consiste basicamente no uso de um agente fotossensibilizador (FS) associado a uma fonte de luz, com comprimento de onda específico, que resulta na inativação de microrganismos por meio de reações fotoquímicas. A eritrosina é um corante que se enquadra nas características necessárias para ser um bom fotossensibilizador, é utilizado como corante biológico e na produção de produtos corantes do biofilme dental [1, 9, 12, 13].

## **2.3. Espectroscopia Fotoacústica**

### **2.3.1. Breve Histórico**

O efeito fotoacústico foi observado pela primeira vez em 1880 quando Alexandre Graham Bell desenvolveu o fonofone. Ele observou que a incidência de luz solar modulada em um sólido, dentro de uma célula fechada, gerava no ar a sua volta sons audíveis, que podiam ser amplificados e captados a partir de um tubo ligado a esta célula [1]. Posteriormente, ele estudou o efeito fotoacústico em líquidos e gases chegando à conclusão de que os efeitos sonoros dependiam do tipo de substâncias que eram expostas à radiação, e que os sons eram específicos de cada raio do espectro que eram absorvidos pelo corpo. Segundo suas conclusões, a intensidade do sinal fotoacústico dependia da quantidade de luz absorvida pelo material da célula e o efeito fotoacústico em sólidos era dependente da absorção de luz [46].

Nos experimentos realizados por Bell, o detector era seu próprio ouvido, o que dificultava muito a obtenção de dados quantitativos, provavelmente esta foi uma das causas que levaram os experimentos fotoacústicos a serem interrompidos por aproximadamente 50

anos [46]. Com o desenvolvimento de microfones mais sensíveis, os estudos sobre o efeito fotoacústico foram retomados, com medidas sendo feitas em gases. O gás, neste caso, absorve os fótons incidentes resultando em aumento de energia cinética das suas moléculas, gerando assim uma flutuação na pressão dentro da célula [48].

As pesquisas nessa área ficaram restritas a aplicações em gases até 1973, quando começaram estudos de espectroscopia em sólidos utilizando o efeito fotoacústico. Por volta de 1980, Parker, Rosencwaig e Gersho [48] sugeriram um modelo padrão de célula fotoacústica para amostras sólidas e desenvolveram toda a teoria que descreve o fenômeno, com isso, a partir dos experimentos realizados, mostraram que o mecanismo básico responsável pelo surgimento do sinal fotoacústico era o fluxo periódico de calor entre o gás contido na célula fotoacústica e a superfície da amostra, tratando-se assim de um efeito fototérmico. Estudos posteriores mostraram que não só este mecanismo, mas outros como a contração, expansão e flexão da amostra, assim como a liberação de gases em razão da excitação óptica também podem contribuir para a geração do sinal fotoacústico. Uma das características dessa técnica, além da obtenção de espectros de absorção óptica, é permitir a realização de estudos de perfil de profundidade ao longo da amostra [49].

Essa técnica passou a ser empregada em diversas aplicações, inclusive em materiais biológicos. Rosencwaig [50], descreveu em seu trabalho, que embora muitos materiais biológicos estão naturalmente em um estado solúvel, existem os ligados a membranas ou parte da estrutura de ossos ou tecidos. Estes materiais são insolúveis e biologicamente funcionam em uma matriz sólida. Normalmente, dados ópticos desses materiais são difíceis de se obter, pois quando solubilizados, podem ocorrer mudanças em sua estrutura. O efeito fotoacústico foi descrito como uma nova técnica para investigar as propriedades de materiais biológicos, tanto *in situ* ou separados de sua matriz.

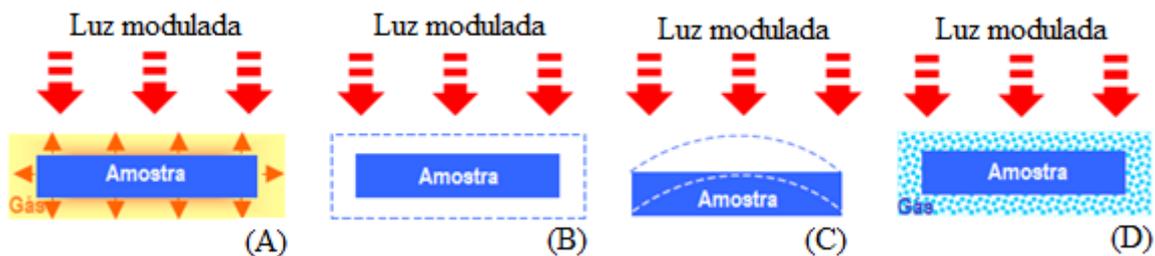
### **2.3.2. O Efeito Fotoacústico**

O efeito fotoacústico é gerado quando incidimos um feixe de luz modulado na amostra posicionada no interior de uma célula fechada contendo gás, podendo ser o próprio ar. A luz absorvida é transformada em energia térmica, como consequência ocorre a excitação dos níveis de energia da amostra. O aquecimento periódico da amostra resulta em uma onda de pressão no gás, essa variação de pressão é detectada por um microfone que está acoplado a célula resultando no sinal fotoacústico. A intensidade do sinal depende da frequência de

modulação da luz que incide na amostra. A difusão, expansão e flexão térmica bem como o efeito fotobárico são os diferentes mecanismos que geram ondas acústicas no gás devido aos pulsos de calor produzidos na amostra, conforme mostra a Fig. 5 [46, 47, 51].

### 2.3.3. Mecanismos de Geração do Sinal Fotoacústico

No mecanismo de difusão térmica a incidência da luz modulada sobre a amostra produz um fluxo térmico desde a amostra até o gás circundante, provocando neste uma variação de temperatura que depende da frequência de modulação da luz, como ilustrado na Fig. 5 (A). Entretanto, apenas uma fina camada do gás, a que está próxima à interface amostra-gás, é que responde termicamente às flutuações de temperatura da amostra. Esta camada de gás que está em contato com a amostra se aquecerá e passará a se expandir e contrair periodicamente funcionando como um pistão, gerando uma onda de pressão no interior da câmara fechada. O sinal fotoacústico resultará da variação de pressão detectada por um microfone acoplado ao sistema. Este mecanismo é conhecido como modelo de pistão simples [46, 47, 51]. A difusividade térmica é um parâmetro que dá uma medida de como o calor se propaga na amostra e tem um valor único para cada material.



**Figura 5:** Representação dos mecanismos de geração do sinal fotoacústico: (A) Difusão térmica; (B) Expansão térmica; (C) Flexão termoelástica; (D) Efeito fotobárico [48].

Na expansão térmica é a própria amostra que se expande e contrai devido ao aquecimento periódico da amostra, causado pela absorção da luz modulada. Deste modo o seu movimento atua sobre a coluna de gás novamente semelhante a um pistão, o qual provoca a onda acústica no gás (Fig. 5 (B)). Neste caso, a intensidade do sinal depende do coeficiente de expansão térmica do material. Este mecanismo é também conhecido como modelo do pistão composto [46, 47, 51].

No processo de flexão termoelástica (Fig.5 (C)) surge quando temos uma amostra presa em suas extremidades. A luz que incide sobre a amostra gera um gradiente de

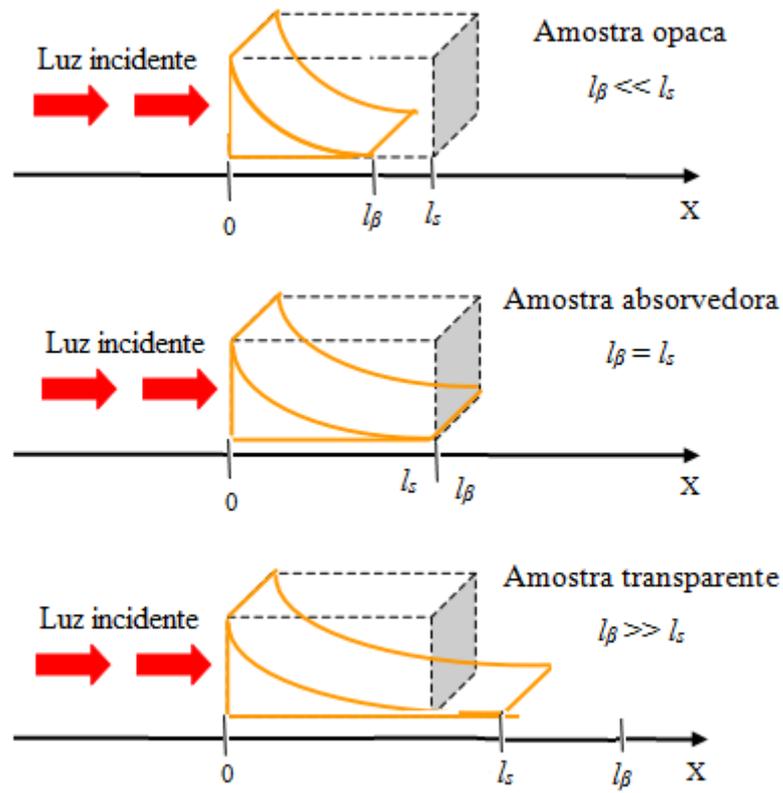
temperatura dentro dela, que é perpendicular à sua face de maior dimensão. Devido a este gradiente, a expansão térmica será dependente da profundidade, flexionando a amostra. Esta flexão periódica faz com que a superfície da amostra produza o sinal fotoacústico [46, 47, 51].

O efeito fotobárico acontece em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica (Fig. 5 (D)). É o que acontece, por exemplo, com folhas de plantas que liberam oxigênio quando realizam fotossíntese induzida pela luz incidente durante a medida [46, 47, 51].

Neste estudo, o modelo mais apropriado para estudar tecidos dentários, no caso a dentina sólida, é o de difusão térmica, pois consideramos que o aquecimento periódico não é suficiente para causar expansão ou contração da amostra, e ainda a amostra fica livre dentro da célula fotoacústica, sendo assim o aquecimento periódico também não é suficiente para flexionar a amostra.

### 2.3.4. Comportamento Óptico e Térmico da Amostra

É importante lembrar que a amostra não absorve totalmente a radiação eletromagnética incidente sobre ela, a luz que não é absorvida é refletida ou transmitida. No mecanismo de difusão térmica a contribuição é da luz absorvida, parte dela interage com as moléculas da superfície do material e o restante será absorvido gradativamente pela amostra, interagindo assim, com camadas moleculares cada vez mais profundas. Ao longo da espessura da amostra, a penetração da radiação, ocorre de tal forma que o feixe incidente diminui exponencialmente de acordo com a Lei de Beer: a absorção óptica do material é caracterizada pela distância de penetração do feixe na amostra até sua intensidade ser reduzida a  $1/e$  (onde  $e$  é uma constante matemática aproximadamente igual a 2,71828, conhecida como número de Euler). O comprimento de absorção óptica  $l_\beta$  (fração de luz absorvida por unidade de comprimento do meio), definido como  $l_\beta = 1/\beta$ , é o parâmetro que mede essa absorção, sendo  $\beta$  o coeficiente de absorção óptico da amostra. Considerando o parâmetro  $l_\beta$  e uma amostra de espessura total  $l_s$  podemos defini-la para (Fig. 6) [38, 41, 45]: (i)  $l_\beta \ll l_s$ , amostra opticamente opaca; (ii)  $l_\beta \sim l_s$ , amostra absorvedora e (iii)  $l_\beta \gg l_s$ , amostra opticamente transparente.



**Figura6:** Representação da absorção óptica de materiais parcialmente transparentes, absorvedores e opacos [47].

Após a radiação ser absorvida, acontecem processos de transferência da energia térmica que é gerada na profundidade atingida pela luz. A transmissão da energia térmica para o restante da amostra caracteriza a difusão térmica, que por sua vez, depende da profundidade do ponto de geração e da frequência de modulação da luz utilizada. O comprimento de difusão térmica, é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode-se propagar até a superfície contribuindo para a geração do sinal fotoacústico. Esse comprimento é definido pela seguinte expressão:

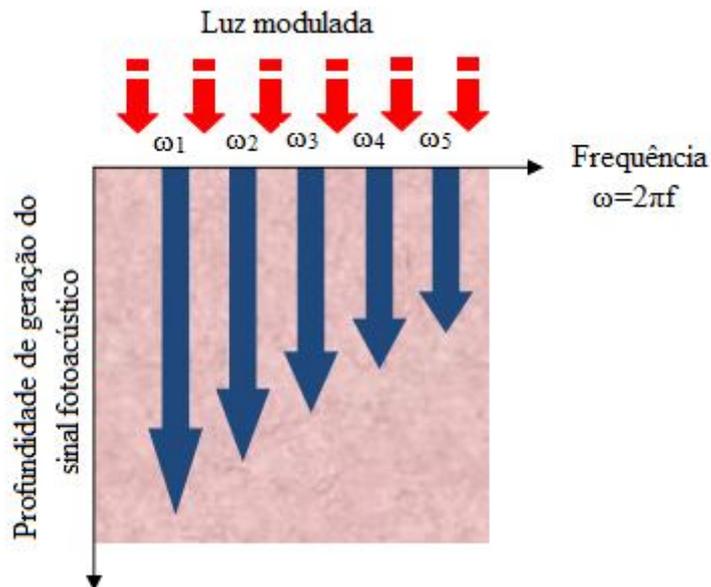
$$\mu_s = \left(\frac{D}{\pi f}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

em que  $\mu_s$  é comprimento de difusão térmica (cm),  $D$  é a difusividade térmica ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) e  $f$  é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz que vai iluminar a amostra sob teste.

### 2.3.5. Classificação Térmica da Amostra

As amostras são classificadas termicamente de acordo com a comparação de suas espessuras  $l_s$  em relação ao comprimento de difusão térmica  $\mu_s$ . Se  $\mu_s \gg l_s$  a amostra é termicamente fina e se  $\mu_s \ll l_s$  a amostra é termicamente grossa.

Mesmo uma amostra opaca pode ter seu espectro resolvido, desde que  $\mu_s < l_s$ . Do contrário, a amostra se diz saturada, o que indica que toda luz absorvida gera sinal acústico. A saturação pode ser contornada diminuindo-se as dimensões da amostra, tornando-a não opaca, ou aumentando-se a frequência de modulação, o que reduz o valor de  $\mu_s$ . Isto porque com o aumento da frequência o sinal é gerado em camadas cada vez mais superficiais, e devido à dependência do comprimento de difusão  $\mu_s$  com a frequência de modulação, é possível efetuar uma análise do perfil de profundidade no material. Ou seja, é possível obter espectros de absorção óptica das diferentes camadas da amostra em estudo.



**Figura 7:** Esquema do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico, a frequência cresce a partir de  $\omega_1$  até  $\omega_5$  sendo  $\omega = 2\pi f$ .

A Figura 7 é uma ilustração do perfil de penetração da luz na amostra, esboçando o que ocorre se a frequência angular de modulação da luz ( $\omega$ ) é modificada. As setas representam as profundidades até onde o sinal fotoacústico é gerado, para a respectiva frequência de modulação. Nesta ilustração, a frequência cresce a partir de  $\omega_1$  até  $\omega_5$ . Quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico, a dependência da profundidade com a frequência está descrita na equação (1).

### 2.3.6. A Célula Fotoacústica Fechada

O modelo padrão de célula fotoacústica, proposto por Rosencwaig e Gersho [44], conhecido como modelo RG, consiste de uma pequena célula com gás, com uma amostra sólida colocada dentro dela a uma distância  $l_g$  de uma janela de vedação, que deve ser transparente.

Observa-se na Fig. 8 a configuração unidimensional padrão de célula fotoacústica. Através da janela incide-se um feixe de luz modulada. Nas paredes laterais da célula é inserido um microfone capacitivo que capta as conseqüentes flutuações de pressão no gás, provocada pela transferência de calor oriundo do aquecimento periódico do sólido.

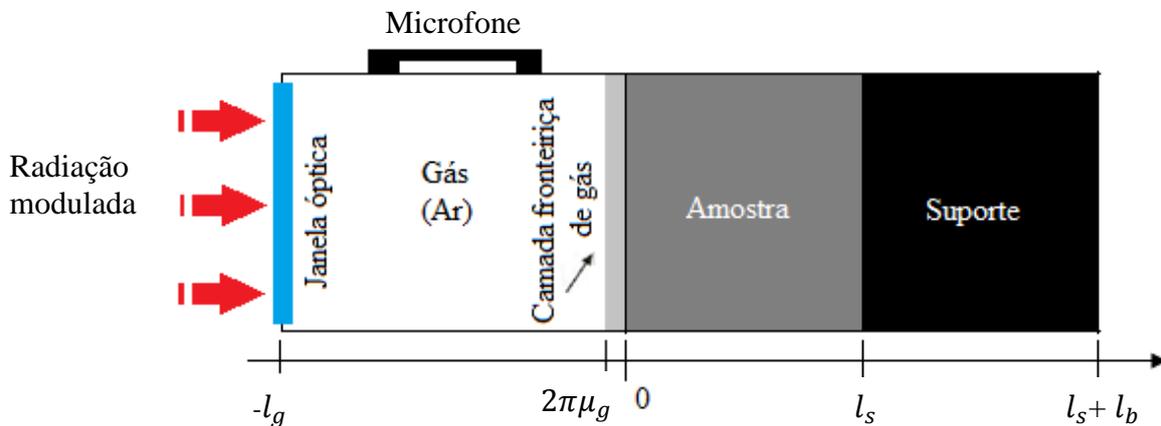


Figura 8: Representação da célula fotoacústica [1].

Tem-se um sistema unidimensional o qual 0 (zero) é a origem; a espessura do gás é  $l_g$ , a espessura da amostra é  $l_s$  e a espessura do suporte é  $l_b$ , logo  $l_s + l_b$  é a espessura da amostra mais a do suporte. Se a coluna de ar for termicamente grossa, ou seja,  $l_g > 2\pi\mu_g$ , a intensidade do sinal tende a se anular, pois sua intensidade se torna muito reduzida. A intensidade de sinal fotoacústico máxima é dada quando  $l_g \cong 2\pi\mu_g$ . A obtenção de espectros de absorção óptica gerados por meio do sinal fotoacústico, devido à interação da matéria com uma radiação modulada de comprimento de onda conhecido, é o que caracteriza a técnica espectroscopia fotoacústica.

A amplitude e a fase são os principais parâmetros em medidas experimentais com a fotoacústica. A intensidade do sinal fotoacústico depende linearmente da potência da lâmpada, e esta relacionado com o inverso da temperatura no meio, com o inverso do comprimento da coluna de gás, sendo proporcional ao perfil de temperatura na interface

amostra-gás. A intensidade também está relacionada diretamente com as propriedades de absorção, difusão e profundidade da amostra onde a radiação é absorvida, já que o perfil de temperatura depende da quantidade de radiação transformada em calor [46, 47, 51].

A fase independe da potência de iluminação, e pode ser explorada com vantagens sobre a medida da intensidade. Possíveis variações da potência modificam majoritariamente a intensidade, enquanto não influenciam a magnitude da fase do sinal. A fase é diferente para cada comprimento de difusão térmica, variando com a profundidade da amostra, onde há geração de calor. Além disso, ela pode ser diferente para cada mecanismo de absorção óptica e/ou relaxação térmica, ou seja, pode distinguir diferentes centros absorvedores da amostra [52].

### 2.3.7. Método de Separação dos Espectros na Fase do Sinal Fotoacústico

O método fotoacústico de separação dos espectros da fase permite analisar o perfil de profundidade de amostras que possuem dois centros absorvedores distintos ou duas camadas. Se existir centros absorvedores diferentes ou duas camadas superpostas, teremos uma diferença de fase  $\theta_B$  que corresponde à detecção do sinal da camada inferior, este sinal corresponde a média de todos os pontos da camada inferior que contribuem na geração do sinal fotoacústico. Por meio da análise da fase dos sinais  $S_A$  e  $S_B$  de cada camada, supondo que A e B são centros ou camadas da amostra, obtemos os espectros de absorção das diferentes camadas [52].

As medidas da intensidade ( $S_f$ ) e da fase ( $\phi$ ) fotoacústicas são dadas por meio de dois sinais em quadratura  $S_0$  e  $S_{90}$ , que respectivamente estão nas fases  $0^0$  e  $90^0$ . O sinal fotoacústico pode ser representado por meio de um fasor (Fig. 9 (A)):

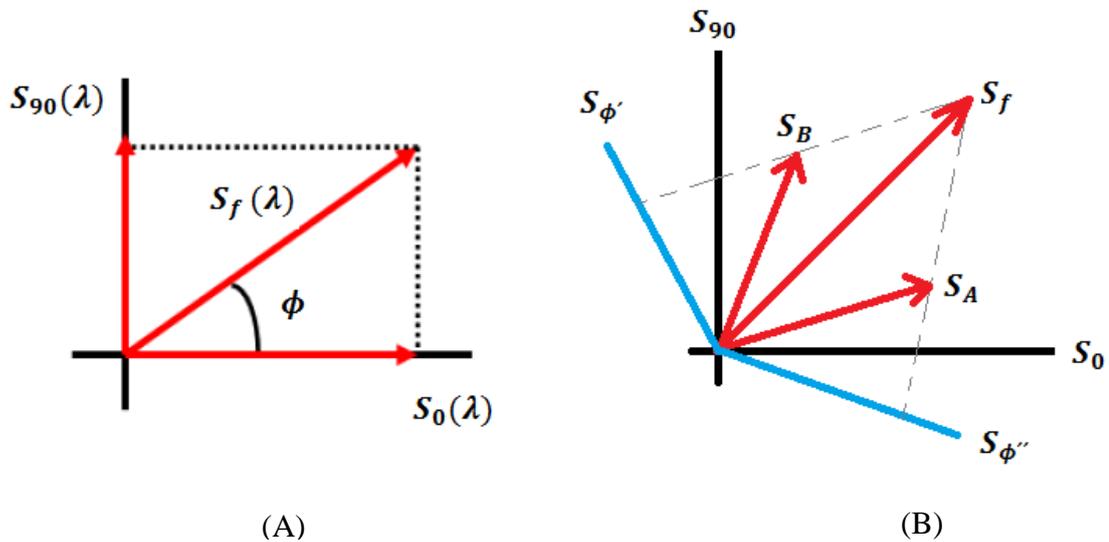
$$\tilde{S} = S_f e^{i\Phi_f} \quad (2)$$

Que pode ser escrito como:

$$S_f^2 = S_0^2 + S_{90}^2 \quad (3)$$

$$\phi = \arctg \frac{S_{90}}{S_0} \quad (4)$$

O sinal observado ( $S_f$ ) é a resultante de dois fasores com um ângulo  $\Psi$  entre eles (Fig. 9 (B)), onde  $\Psi = \phi_B - \phi_A$ . O sinal composto  $\tilde{S}$  é a soma dos fasores das contribuições  $S_A$  e  $S_B$ , eles estão defasados entre si em  $\Psi = \phi_B - \phi_A$ . Os fasores possuem comprimento  $S_A$  e  $S_B$  e correspondem aos sinais fotoacústicos do centro absorvedor A e B.



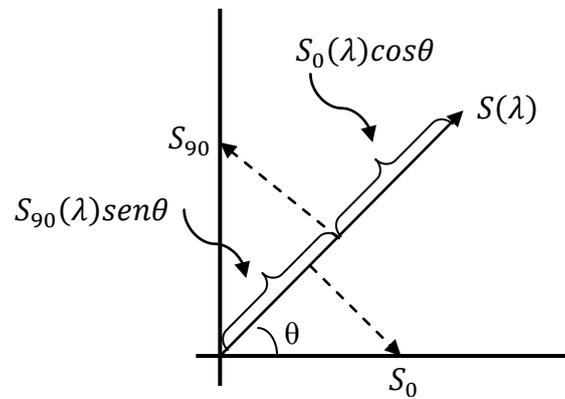
**Figura 9:** (A) Fator do sinal fotoacústico, (B) Composição do espectro em várias fases [52].

A separação dos espectros da fase parte da utilização de dois espectros em quadratura (para cada comprimento de onda da medida),  $S_0(\lambda)$  e  $S_{90}(\lambda)$ . Com ele é possível realizar a composição de espectros para várias fases  $\theta(\lambda)$ , partindo da Eq. 5:

$$S_\theta = S_0(\lambda)\cos\theta + S_{90}(\lambda)\sen\theta \quad (5)$$

Se os espectros das duas camadas são conhecidos, pelo aspecto das curvas de  $S_\phi$  obtidas para vários  $\phi$  encontra-se os ângulos  $\phi'$  e  $\phi''$  nos quais os espectros conhecidos  $S_A$  e  $S_B$  são reproduzidos.

Na Fig. 10, temos as projeções em quadraturas.



**Figura 10:** Diagrama fasorial representando os componentes do sinal fotoacústico [1].

Quando a camada absorvedora A é minimizada no ângulo  $\phi'$ , ela é maximizada em  $\phi_A = \phi' \pm 90^\circ$ . Consequentemente, o espectro da camada B ou parte de sua projeção, podem ser isoladas em  $\phi'$ . O centro B será encontrado em  $\phi_B = \phi'' \pm 90^\circ$  e o centro A será isolado em  $\phi''$ .

Para picos de absorção A e B localizados em comprimentos de ondas distintos, a determinação de  $\phi_A$  e  $\phi_B$  pode ser feita isolando o espectro, por meio da projeção em um diagrama fasorial. A precisão para a medida experimental da fase de um componente espectral é menor que  $1^\circ$ . Para ser possível realizar separação espectral em espectros gerados por duas camadas adjacentes ou por dois centros absorvedores, é necessário que o atraso da fase medida seja maior que o da instrumentação. Assim, assume-se que o limite para a diferença de fase será de  $\Psi > 5^\circ$ .

## 2.4. Espalhamento Raman

O espalhamento Raman é oriundo da interação da radiação eletromagnética (luz monocromática) com o movimento vibracional dos núcleos dos átomos, considerando uma distribuição média dos elétrons da nuvem eletrônica, ocorrendo de forma inelástica, ou seja, a radiação espalhada pelas moléculas possuem fótons com mesma frequência da radiação incidente (espalhamento elástico), e pode ter também um número pequeno de fótons com frequência alterada ou deslocada (espalhamento inelástico) que é chamado de espalhamento Raman.

Chandrasekhara Venkata Raman, em 1928 observou que quando um feixe de luz monocromática (normalmente um laser), com uma determinada frequência, atravessava um material, a luz espalhada era composta por radiação com mesma frequência e outras linhas menos intensas. Com esse estudo Raman ganhou no Nobel em 1930, e esse efeito recebeu seu nome. Raman utilizou um espectrômetro de bolso, a luz do sol como fonte de irradiação e o

olho humano como detector para observar o fenômeno. Observou que a luz incidente sobre a amostra sofria uma mudança na sua direção, com o auxílio de um espectrógrafo, com prismas como elemento dispersor, notou que havia outras linhas com pequenas modificações, além da linha da radiação que incidia, o espalhamento inelástico gera mudanças na direção e varia o comprimento de onda da radiação que incide. O espalhamento inelástico da luz é, como já dito, conhecido como espalhamento Raman, e o espalhamento elástico é chamado de espalhamento Rayleigh [53].

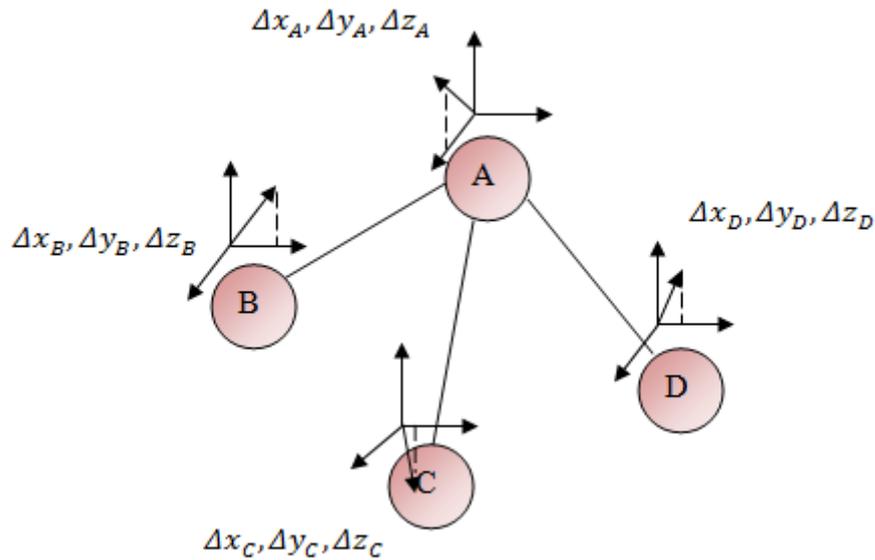
### 2.4.1. Vibrações Moleculares

Vibrações moleculares são provenientes dos movimentos dos átomos ao longo do tempo que originam alongamentos das ligações moleculares e deformações angulares. É possível decompor esses movimentos complexos em modos normais de vibração associados a níveis de energia. Nos modos normais de vibração todos os átomos vibram na mesma frequência, mas em direções e amplitudes diferentes.

Para uma molécula de  $N$  átomos é necessário usar coordenadas  $x$ ,  $y$  e  $z$  para descrever as posições de cada um dos átomos, assim, essa molécula exige um total de  $3N$  coordenadas para descrever suas posições no espaço. A mudança na posição de cada átomo pode se dividir em uma mudança na coordenada  $x$ , uma na  $y$  ou uma na  $z$ . Essas variações são escritas como  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  e  $\Delta z$  para cada um dos  $N$  átomos. Tais mudanças nas coordenadas podem ter valores diferentes, então, uma molécula com  $N$  átomos pode ter um total de  $3N$  mudanças nas coordenadas para descrever seus movimentos (Fig. 11).

Como os átomos estão livres para se mover em  $3N$  direções diferentes, entre si, dizemos que a molécula tem  $3N$  graus de liberdade.

Quando a molécula toda se move no espaço, podemos descrever esses movimentos como translações do centro da massa da molécula. Em movimentos translacionais, os átomos da molécula não se movem um em relação ao outro. Essas mudanças nas coordenadas podem ser escolhidas simultaneamente para que dois dos movimentos (em moléculas lineares) ou três dos movimentos (em moléculas não lineares) de todos os átomos correspondam à rotações da molécula sobre um eixo molecular.



**Figura 11:** Variações  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  e  $\Delta z$  para cada um dos átomos ( $N = 4$ ) na representação da descrição dos seus movimentos [70].

Para os movimentos de rotações na molécula, assim como para as translações, os átomos movem-se juntos, de tal maneira que a molécula toda se move. Diferentemente das translações, nas rotações, o centro de massa da molécula não se move no espaço. Contudo, do mesmo modo que os graus de liberdade translacionais, os átomos não se movem uns em relação aos outros. Isto resulta em  $3N-5$  (para moléculas lineares) ou  $3N-6$  (para moléculas não lineares) combinações de movimentos independentes dos átomos dentro da molécula, sendo que, para movimento, a frequência de cada vibração do átomo é exatamente a mesma.

As moléculas lineares não tem rotação definidas sobre o seu eixo internuclear e, por isso, falta um grau de liberdade rotacional ( $3N-5$ ). Essa falta é compensada por um grau de liberdade vibracional extra. As moléculas lineares têm pelo menos uma vibração perpendicular à outra vibração de mesma frequência, portanto, elas têm a mesma energia e ditas degeneradas.

Nessas combinações, os átomos estão se movendo uns em relação aos outros, mas o centro de massa da molécula inteira não muda. Esses movimentos atômicos internos são os graus de liberdade vibracionais ou, simplesmente, as vibrações da molécula. Tais mudanças de coordenadas são chamadas de modos normais de vibração.

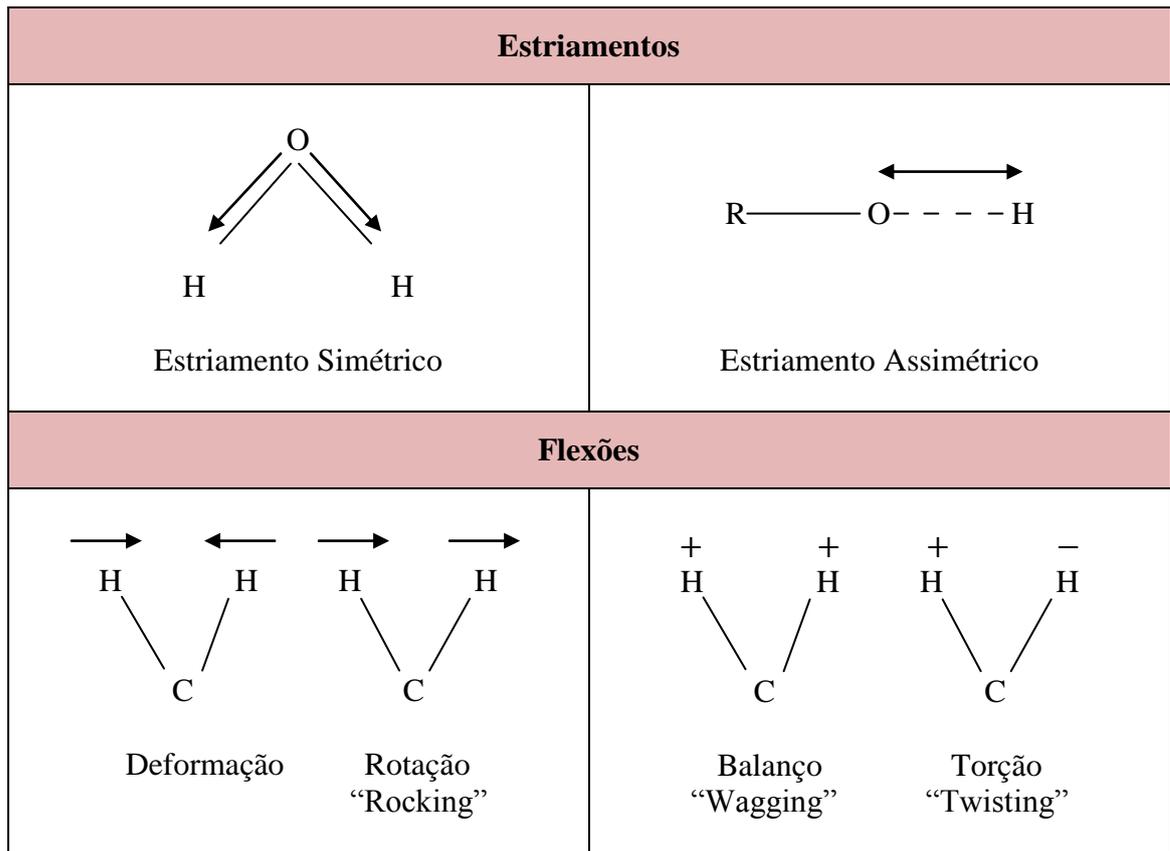
Os átomos em moléculas também podem se mover em relação ao outro, isto é, os comprimentos de ligação podem variar ou um átomo pode sair do seu plano atual. Esta é uma descrição de alongamento e movimentos de flexão que são referidos coletivamente como

vibrações. Para uma molécula diatômica, apenas uma vibração que corresponde ao se esticar e comprimir da ligação é possível. Isto representa um grau de liberdade vibracional. Para as moléculas poliatômicas contendo vários átomos ( $N$ ) terão  $3N$  graus de liberdade. Os graus de liberdade para uma molécula poliatômica estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Graus de liberdade para molécula poliatômica [55].

<b>Tipo de grau de liberdade</b>	<b>Linear</b>	<b>Não linear</b>
Translação	3	3
Rotacional	2	3
Vibracional	$3N - 5$	$3N - 6$
Total	$3N$	$3N$

Vibrações podem envolver uma mudança no comprimento de ligação, chamado de estiramento ou uma variação angular, chamada de flexão. Algumas ligações podem apresentar estiramento em fase (estiramento simétrico) ou fora de fase (estiramento assimétrico), as flexões também podem ser simétricas ou assimétricas e ainda podem ser no plano ou fora do plano. A Fig. 12 é uma representação de forma resumida dos modos normais de vibração. Há também os modos de vibração do tipo torção que é o giro relativo de dois grupos de átomos sobre uma ligação, que não está mostrada na Fig. 12.



**Figura 12:** Modos normais de vibração de estiramento e flexão [70].

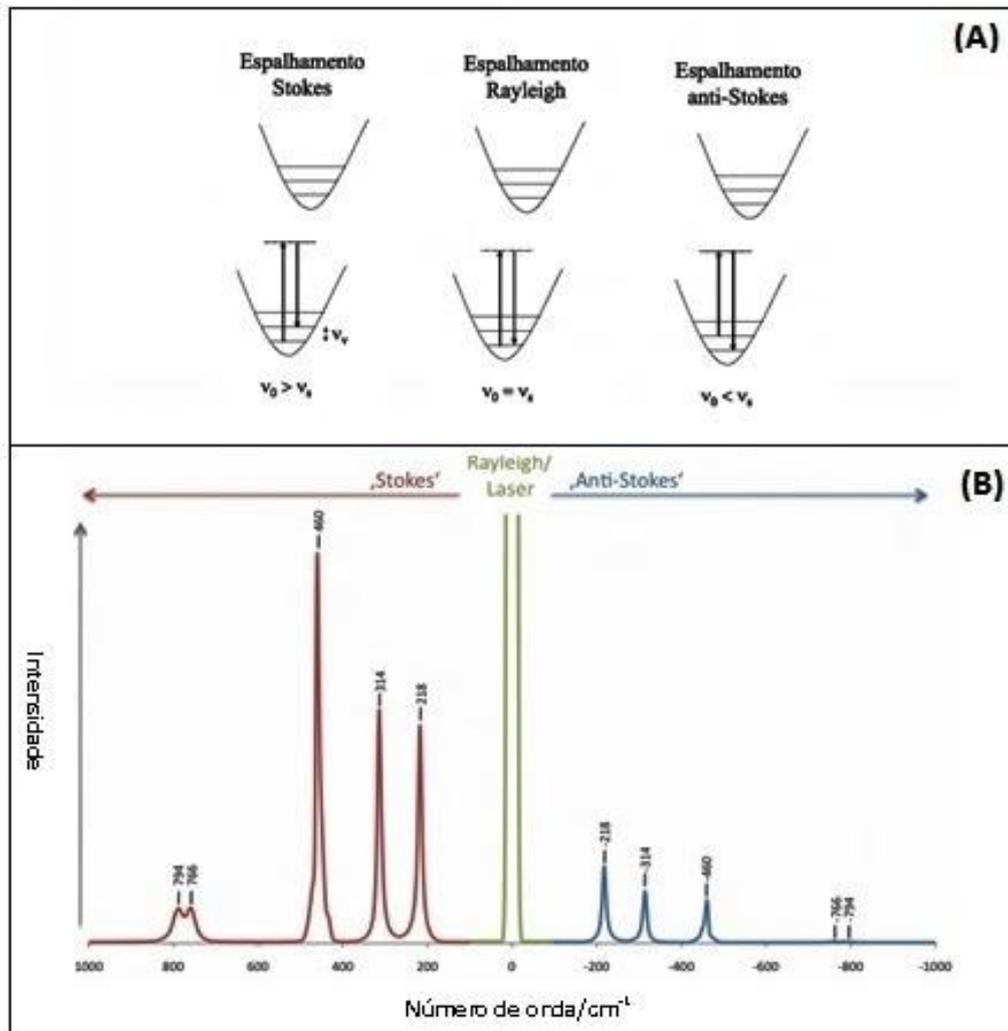
No espalhamento Raman apenas  $10^{-8}$  fótons são espalhados inelásticamente, os demais são absorvidos ou espalhados de forma elástica, e estes podem interagir com os níveis de energia vibracional das moléculas (modos normais de vibração) e assim, perder (ou ganhar) energia.

### 2.4.2. Espectroscopia Raman

Baseado na detecção do espalhamento Raman, a espectroscopia Raman é uma técnica que fornece informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas dos materiais, permitindo a caracterização da estrutura microscópica da matéria. O espalhamento Raman, a partir do conceito de níveis de energia, é considerado como uma transição de estados da molécula, que passa do estado fundamental para um estado vibracional excitado, com absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado [54]. O espalhamento inelástico da luz pode resultar em um fóton de menor ou maior energia. Assim a espectroscopia Raman é uma técnica que mede essas transições de estados.

Na Figura 13, o quadro (A) é um esquema das transições dos níveis de energia para uma molécula quando o fóton incidente sofre espalhamento: Stokes, Rayleigh e Anti-Stokes e o quadro (B) é a representação de um espectro (intensidade *versus* número de onda) mostrando os picos referentes aos espalhamentos do tipo Stokes, Rayleigh e Anti-Stokes. No espalhamento Rayleigh, o fóton leva o sistema para o estado virtual e retorna ao estado fundamental com a mesma energia, ou seja, o fóton incidente é espalhado sem perder sua energia inicial. No espalhamento Stokes, o fóton encontra a molécula no estado vibracional fundamental e leva o sistema para um estado virtual, na sequência o sistema decai e o fóton espalhado deixa a molécula em um estado vibracionalmente excitado. Já no espalhamento anti-stokes, o fóton encontra a molécula em um estado vibracional excitado, a molécula retorna ao estado fundamental a partir de um estado virtual, ocorrendo o decaimento de um fóton com maior energia que o fóton incidente [56].

Os espectros nas regiões Stokes e anti-Stokes (Fig. 13 (B)) apresentam diferentes intensidades, o espalhamento Stokes tem intensidade maior que o anti-Stokes. Isso ocorre devido à lei de distribuição de Boltzmann, que rege o comportamento clássico da distribuição de partículas. Em temperaturas medianas, a maioria das moléculas encontram-se no estado fundamental, o que explica as linhas Stokes apresentarem maiores intensidades do que as linhas anti-Stokes, as quais se originam do estado excitado com menor população. Para frequências baixas as intensidades Stokes e anti-Stokes são comparáveis, mas para frequências vibracionais muito altas a Stokes predomina e é muito difícil observar as anti-Stokes [59].

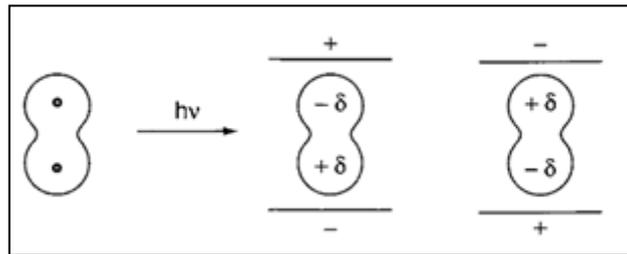


**Figura 13:** Espalhamento de luz: (A) Representação das transições de níveis de energia para um fóton que sofre espalhamento Stokes, Rayleigh e Anti-Stokes; (B) Representação de um espectro de espectro com os espalhamentos Stokes, Rayleigh e Anti-Stokes [57, 58].

Para que uma molécula seja Raman ativa, ou seja, apresente espalhamento Raman ao ser excitada por uma luz monocromática é necessário que sejam satisfeitas certas condições, estas são chamadas de regras de seleção. A regra de seleção a ser satisfeita está ligada à vibração do dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente [59, 60]. Quando uma molécula é colocada em um campo elétrico sofre distorção, uma vez que os núcleos carregados positivamente são atraídos para o pólo negativo, e os elétrons em direção ao pólo positivo do campo elétrico (Fig. 14). Esta separação de cargas produz um momento de dipolo induzido ( $\bar{P}$ ) dado por:

$$\bar{P} = \alpha \bar{E} \quad (6)$$

$\vec{E}$  corresponde ao vetor do campo elétrico da radiação incidente e  $\alpha$  a polarizabilidade da molécula.



**Figura 14:** Polarização de uma molécula diatômica em um campo elétrico [61].

Assim a regra geral para as transições Raman vibracionais é que a polarizabilidade da molécula deve se alterar com a vibração da molécula. Esta condição implica que tanto moléculas homonucleares quanto heteronucleares possam ser ativas no espectro Raman vibracional. Isso porque ambas expandem-se e contraem-se durante a vibração, o controle dos núcleos sobre os elétrons é variável, com isso a polarizabilidade da molécula também se altera.

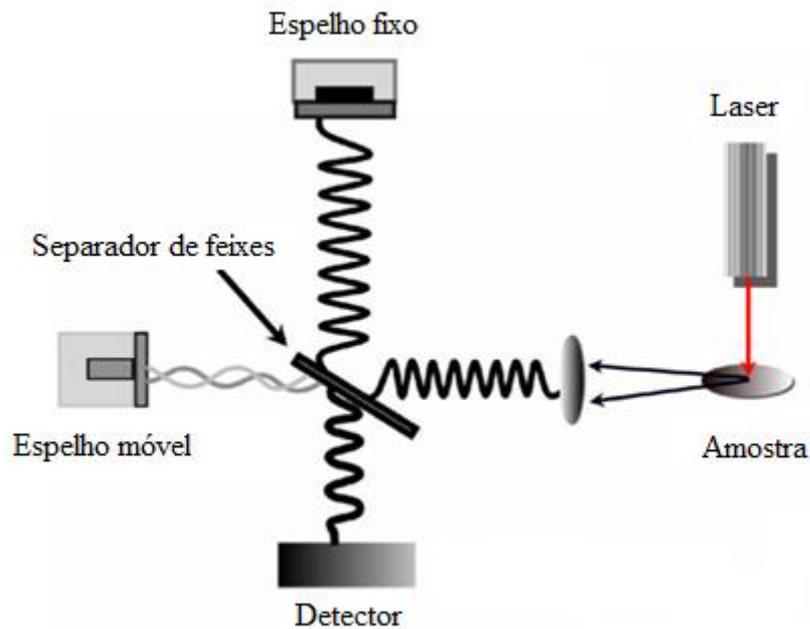
Um espectrômetro coleta a luz espalhada (Raman e Rayleigh), o sinal que chega ao detector é convertido na forma de espectro, onde a intensidade é dada em função da sua mudança de frequência. Se o material analisado emitir luminescência no comprimento de onda excitado ao medir o espalhamento Raman, este sinal também contribui para o espectro Raman, esse tipo de sinal é indesejado e deve ser eliminado ou minimizado. O espectro Raman de uma substância é constituído por uma série de picos ou bandas, características da banda vibracional dela [54].

### 2.4.3. Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)

A espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman), utiliza um interferômetro, baseado no interferômetro de Michelson, para produzir um interferograma, que decodifica as frequências do espalhamento Raman em um único sinal, reduzindo as interferências de luminescência [54].

O interferômetro (Fig. 15) possui um separador de feixe otimizado para a radiação no infravermelho próximo, que divide o espalhamento Raman em dois feixes ópticos, onde um é transmitido e o outro refletido. O transmitido se propaga até um espelho plano móvel e o refletido até um espelho plano preso a um mecanismo que permite o espelho mover-se poucos

milímetros do separador de feixes, após a reflexão nos espelhos planos, os feixes retornam ao divisor de feixe e se interferem construtivamente ou destrutivamente no detector [54].



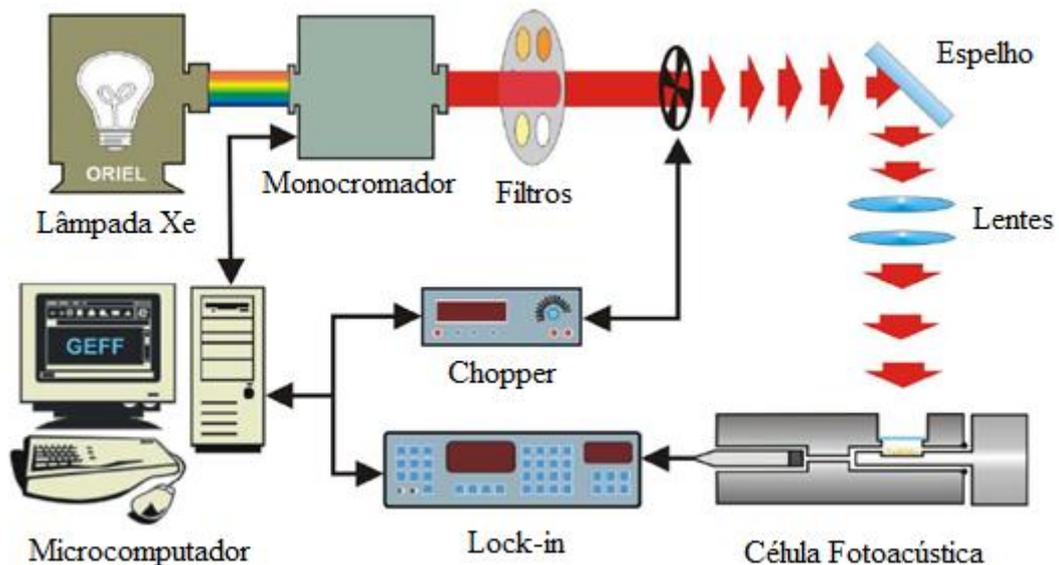
**Figura 15:** Esquema de um interferômetro de Michelson utilizado um sistema de espectroscopia Raman com transformada de Fourier [54].

Os espectros vibracionais são geralmente representados por espectros de frequência, pois o sinal do interferograma não é interpretado diretamente. O computador, utilizando um algoritmo para transformada de Fourier, decodifica as frequências individuais [54].

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Sinal Fotoacústico

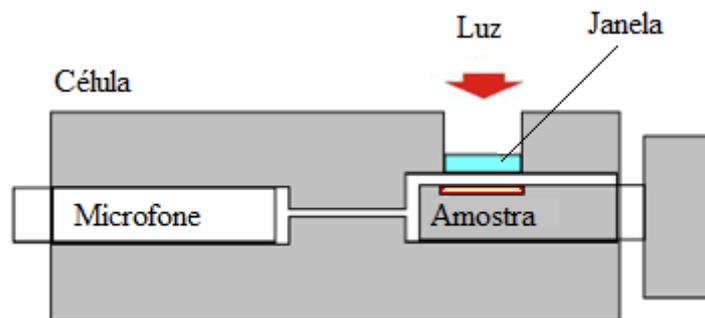
A espectroscopia fotoacústica foi utilizada para a detecção de cárie *in vitro* em dentina. Os espectros foram obtidos nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível, com variação de comprimento de onda de 300 a 750 nm. A potência da fonte foi de 700 W e a frequência de modulação da luz para o estudo das diferenças entre a dentina hígida e cariada foi de 16 Hz, e para análises de permeação 75 Hz. O arranjo técnico esta representado na Fig. 16.



**Figura 16:** Esquema da montagem da técnica de espectroscopia fotoacústica utilizada neste trabalho [47].

Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriël, modelo 68820), com potência nominal de 1000 W, e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. A luz emitida passa por um monocromador, (Oriël, modelo 77250 (1/8 m)), com fendas de entrada e saída, ajustadas em 3,16 mm. A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico, (Stanford Research Systems, modelo SR 540) que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador (*lock-in*). A luz monocromática incide verticalmente na amostra sendo focada por duas lentes, fazendo com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica (Fig. 17) após ser transmitida através

de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de emissão da lâmpada. O microfone acoplado à célula fotoacústica (Brüel & Kjaer, modelo BK 2669) está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para amplificador sincronizado (EG & G Instruments, modelo 5110). O amplificador fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador.



**Figura 17:** Esquema de um corte lateral da célula fotoacústica utilizada neste trabalho [49].

A lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, assim, o sinal é normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

### 3.2. Espectroscopia FT-Raman

Neste trabalho utilizamos a espectroscopia Raman por transformada de Fourier. Os espectros Raman das amostras foram obtidos por meio de um espectrômetro FT-Raman (BRUKER, Vertex 70, Ram II module), o sistema é constituído de um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplado a um módulo de detecção de espalhamento Raman.

O sistema utiliza um laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm com potência nominal de 500 mW e um detector de germânio, que é mantido sob refrigeração de nitrogênio líquido. Um computador conectado ao espectrômetro faz a aquisição dos dados via software (OPUS 6.5), já com correção de *background* e neste também os interferogramas são convertidos em espectros via transformada de Fourier. É possível modificar alguns parâmetros para maximizar o sinal obtido, como a potência do laser incidente na amostra, o

número de varreduras, a resolução espectral e a distância da amostra com relação ao detector. Os parâmetros utilizados neste trabalho foram: potência nominal na amostra de 300 mW, resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e número de varreduras igual a 60. Os espectros finais para cada amostra é uma média das 60 varreduras realizadas e foram armazenados no intervalo espectral entre  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.3. Amostras**

Este estudo foi feito em parceria com o Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá (DOD-UEM). Os estudos foram realizados durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado da aluna Ingrid Gomes Perez Occhi [9], sob orientação da professora Mitsue Fujimaki, do Departamento de Odontologia da UEM. A análise completa sobre a avaliação da permeabilidade dentinária do fotossensibilizador eritrosina utilizado para terapia fotodinâmica encontra-se na referida dissertação, sendo aqui descrita novamente por complementar o estudo em nosso trabalho.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP - da Universidade Estadual de Maringá – UEM, CAAE 14398113.2.0000.0104 e seguiu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) para a utilização de dentes humanos (Anexo 1).

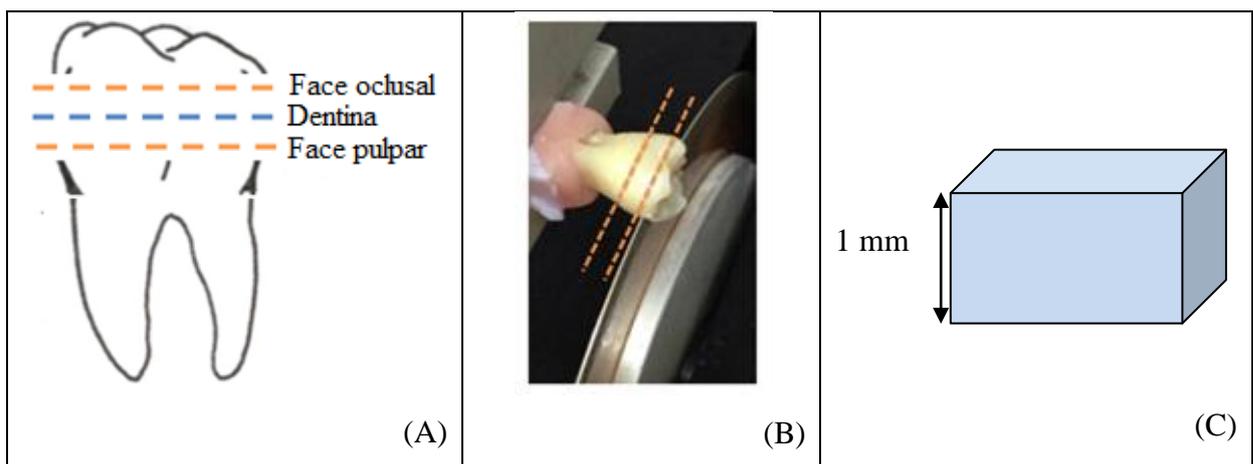
#### **3.3.1 Preparação das Amostras**

Para os estudos utilizando a técnica de espectroscopia fotoacústica foram selecionados 10 dentes humanos jovens, hígidos e com rizogênese incompleta (Fig. 18), provenientes do banco de dentes da Clínica Odontológica da UEM, os quais deram origem a 20 blocos de dentina.



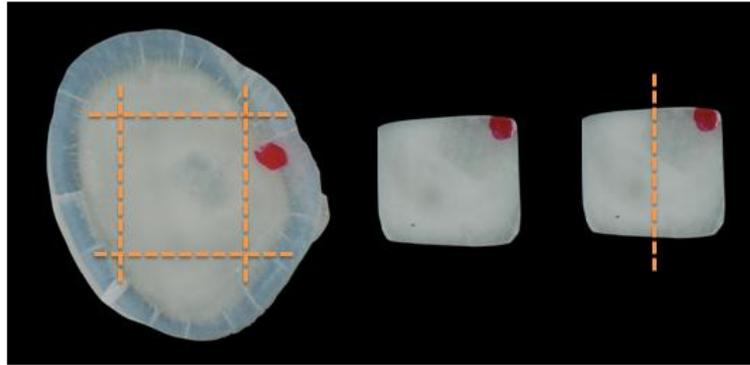
**Figura 18:** Dentes hígidos com rizogênese incompleta [9].

Os dentes foram cortados em forma de bloco (de aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  de espessura) por um disco de diamante (South Bay Technology; Diamond Wheel, San Clement, California, USA) sob refrigeração acoplado a uma máquina de corte (IsoMet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, USA), como mostrado na Fig. 19.



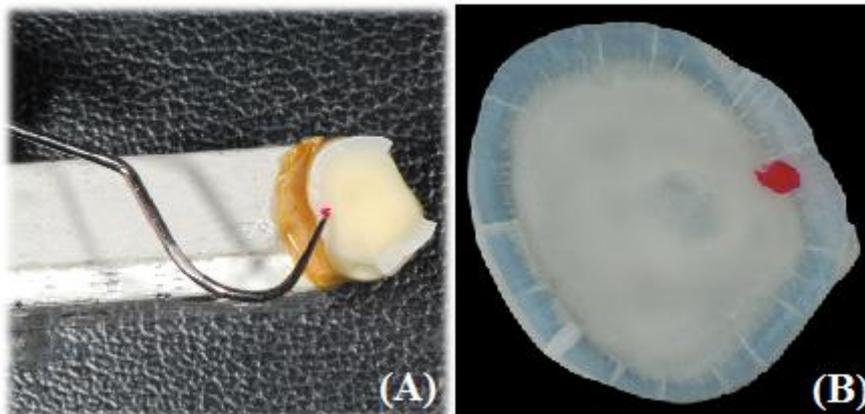
**Figura 19:** (A) Traço laranja indicando o local de realização do primeiro e segundo corte; (B) Dente posicionado para iniciar o corte; (C) Desenho esquemático do bloco de dentina após os cortes.

Cada dente originou dois blocos de dentina (Fig. 20), um bloco de dentina hígida e outro para ser submetido a induções de lesões de cárie artificiais.



**Figura 20:** Blocos de dentina hígida. As linhas tracejadas indicam os locais nos quais foram realizados os cortes para obtenção de blocos de dentina de um mesmo dente [9].

Após a realização do primeiro corte, a superfície oclusal (Fig. 21) foi marcada com um esmalte de unha vermelho para distinguir as duas superfícies, a amostra era posicionada na célula fotoacústica de tal modo a garantir que o sinal não tivesse contribuição do esmalte. É importante distinguir essas superfícies para análise da permeação do fotossensibilizador, pois foi aplicado somente na face oclusal.



**Figura 21:** (A) marcação para distinguir as superfícies; (B) dente após os cortes e com a marcação do esmalte na face oclusal [9].

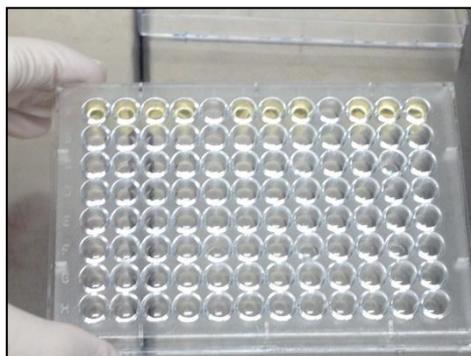
Para a espectroscopia Raman foi utilizado um outro grupo de amostras, dentinas hígidas e com lesão de cárie induzida, provenientes de quatro dentes, que passaram pelo mesmo processo de indução de lesão de cárie e cortes. Esse grupo tem espessura final de aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ . Tanto para espectroscopia fotoacústica como para espectroscopia Raman os blocos de dentina com indução de lesão de cárie tinham espessuras reduzidas

comparada a espessura pós corte, que originaram os fragmentos dentários, pois o biofilme bacteriano causou leve perda de estrutura mineral nas amostras.

Como os resultados deste trabalho, no qual o objetivo principal é um estudo espectroscópico dos efeitos da indução de lesão de cárie em dentina independente da aplicação do fotossensibilizador, foram realizados posterior ao estudo comparativo de permeação do fotossensibilizador em dentina hígidas e com indução de lesão de cárie, realizado pela aluna Ingrid Gomes Perez Occhi, as espessuras finais dos blocos de dentina para a espectroscopia fotoacústica não foram as mesmas para cada amostra.

### 3.3.2 Indução de Cárie

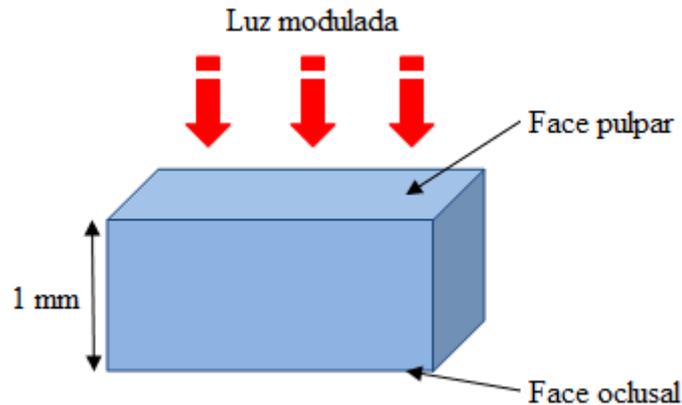
Para o processo de indução de lesão de cárie *in vitro*, os blocos de dentina foram esterilizados por meio de radiação gama no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - ESALQ. Depois de estéreis foram colocados de maneira asséptica em placas (Fig. 22), revestidos de saliva e colocados em meio de cultura inoculados com *Streptococcus mutans* UA 159 para a formação do biofilme (este é formado quando as bactérias são capazes de colonizar e crescer na superfície do bloco de dentina). É importante ressaltar que os blocos ficavam totalmente imersos em meio de cultura que era substituído a cada 24 horas durante 5 dias. Todo o processo de indução de lesão de cárie foi realizado pela aluna Ingrid Gomes Perez Occhi na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. O protocolo completo para indução de lesão de cárie *in vitro* encontra-se na dissertação da referida aluna [9].



**Figura 4:** Placa de poços de fundo côncavo [9].

### 3.3.3 Aplicação do Fotossensibilizador

Para as análises de permeação do fotossensibilizador eritrosina, foi determinado o sinal fotoacústico do bloco de dentina, sobre a face pulpar, antes da aplicação do corante (Fig. 23).



**Figura 23:** Esquema da realização dos espectros antes da aplicação da eritrosina.

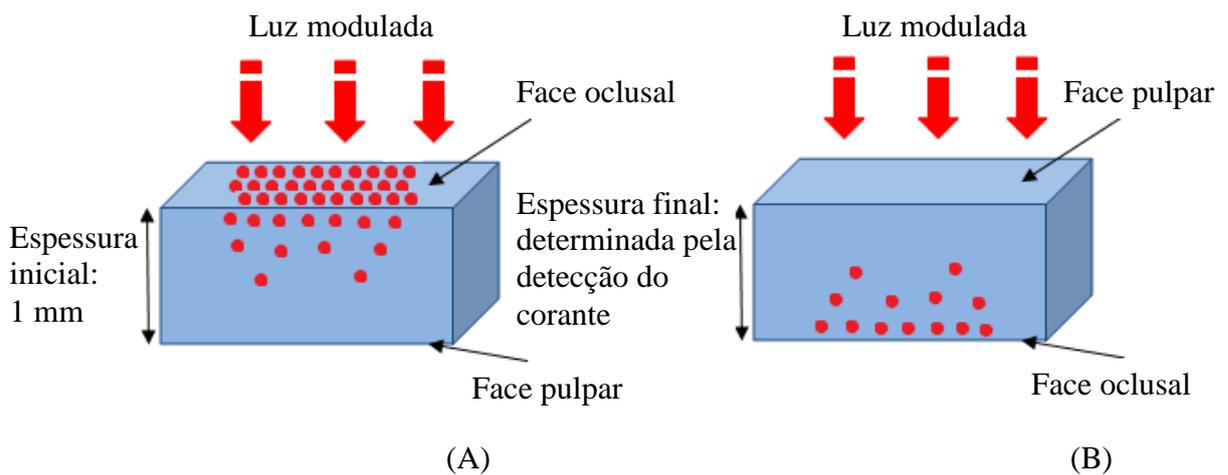
Uma alíquota de 4  $\mu\text{L}$  da solução de Eritrosina na concentração de  $3 \times 10^{-7}$  M (0,3%) ou na concentração de  $5 \times 10^{-6}$  M (5%) foi colocada com pipeta volumétrica e mantida por 30 minutos para permitir penetração (Fig. 24). Após este período, o excesso de corante foi removido com o auxílio de uma haste flexível de plástico com algodões em suas pontas.



**Figura 24:** (A) aplicação da eritrosina na face oclusal; (B) dente com aplicação de eritrosina na face oclusal (marcação com esmalte); (C) dente com aplicação de eritrosina na face oclusal após período de 30 minutos.

Foi realizada a leitura da face oclusal e pulpar para detecção do corante (Fig. 25). Quando não era possível a detecção do corante na espessura inicial, a superfície pulpar da amostra de dentina foi lixada a seco, com lixa de granulação 1500 (Norton Ind. Brasileira),

para redução de sua espessura. Com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo® Digimatic Micrometer; Kanagawa, Japan) a espessura foi gradativamente reduzida e monitorada, e a cada redução, novas leituras utilizando a espectroscopia fotoacústica foram realizadas até que o corante pudesse ser detectado na superfície pulpar. Sendo assim a espessura final de cada bloco era determinada quando a banda do corante era detectada, essa espessura variou significativamente de uma amostra para outra.



**Figura 25:** Esquema da realização dos espectros após aplicação da eritrosina: (A) face oclusal; (B) face pulpar.

## 4. Resultados e Discussão

Neste trabalho avaliamos *in vitro*, por meio da espectroscopia fotoacústica e Raman, a resposta espectral da dentina hígida e cariada tendo como controle o mesmo dente, e aplicamos o método de separação dos espectros na fase do sinal fotoacústico para tentarmos identificar diferenças entre elas.

### 4.1. Estudo da Lesão de Cárie Experimental via Espectroscopia Fotoacústica

A técnica de espectroscopia fotoacústica é empregada em diversas aplicações, desde 1973 passou a ser utilizada também em materiais biológicos [50]. A característica principal desta técnica é o fato de que ao invés de medir a radiação transmitida ou refletida pela amostra, com ela mede-se a fração da energia luminosa que é absorvida e transformada em calor. Ou seja, amostras opacas que espalham luz e na forma semisólida, como é o caso da dentina, podem ser estudadas com essa técnica. A espectroscopia fotoacústica tem se mostrado uma técnica promissora para se realizar estes estudos relacionados a estruturas dentárias.

Para realização do experimento, primeiramente obtemos o sinal fotoacústico das amostras de dentina hígida e cariada (face pulpar), sem a aplicação do corante, como mostrado na Fig. 26 (A), e o sinal fotoacústico do meio em que os blocos de dentina foram submetidos na de indução de lesão de cárie, Fig. 26 (B). Estas leituras foram realizadas em todas as amostras de dentina servindo como controle para comparação após a indução do processo de cárie e a aplicação do corante.

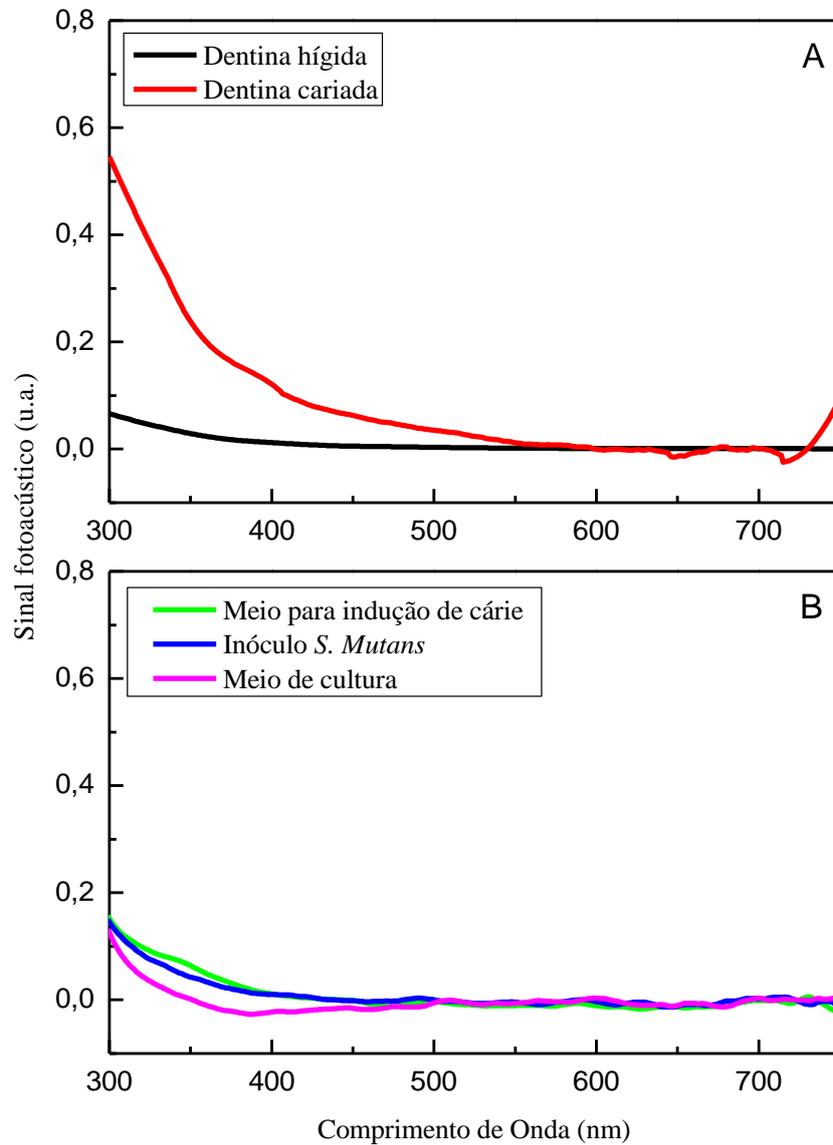
Na Figura 26 (A) comparando os espectros das dentina hígida e cariada nota-se que não é possível observar bandas que as diferenciem, mas sim variações nas áreas das bandas em comum. Para avaliar essas características foi realizada deconvolução gaussiana em todos os espectros provenientes dos fragmentos hígidos e cariados.

A figura 26 (B) mostra o espectro do meio em que os blocos de dentina foram imersos para o processo de indução de lesão de cárie (meio para indução de cárie). Este meio é composto pelo inóculo<sup>1</sup> *S. Mutans*, o meio de cultura<sup>2</sup> da bactéria e sacarose, cujos os

---

<sup>1</sup> Um inóculo é uma amostra de material contendo geralmente uma pequena quantidade dos microorganismos de interesse que se multiplicam aumentando em número e massa.

espectros também estão apresentados na Fig. 26 (B). Nota-se que os espectros para o meio de indução de cárie e seus componentes possuem espectros semelhantes, e com contribuição na mesma região espectral que a dentina hígida e cariada.



**Figura 26:** (A) Sinal fotoacústico da face pulpar da dentina hígida e da dentina cariada artificialmente. (B) Sinal fotoacústico do meio para indução de cárie e seus componentes.

<sup>2</sup> Meio de cultura é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento microbiano, devendo conter fonte de energia para a vida das células.

A Figura 27 mostra o sinal fotoacústico da amostra de dentina hígida (Fig. 27 (A)) e cariada (Fig. 27 (B)) com as curvas gaussianas ajustadas. O ajuste gaussiano utilizada para análise de espectros é a decomposição de uma banda observável nos componentes que a constituem, que se encontram sobrepostos na banda observável, sendo assim utiliza-se uma soma de funções gaussianas, a fim de se obter a curva teórica que melhor represente o dado experimental.

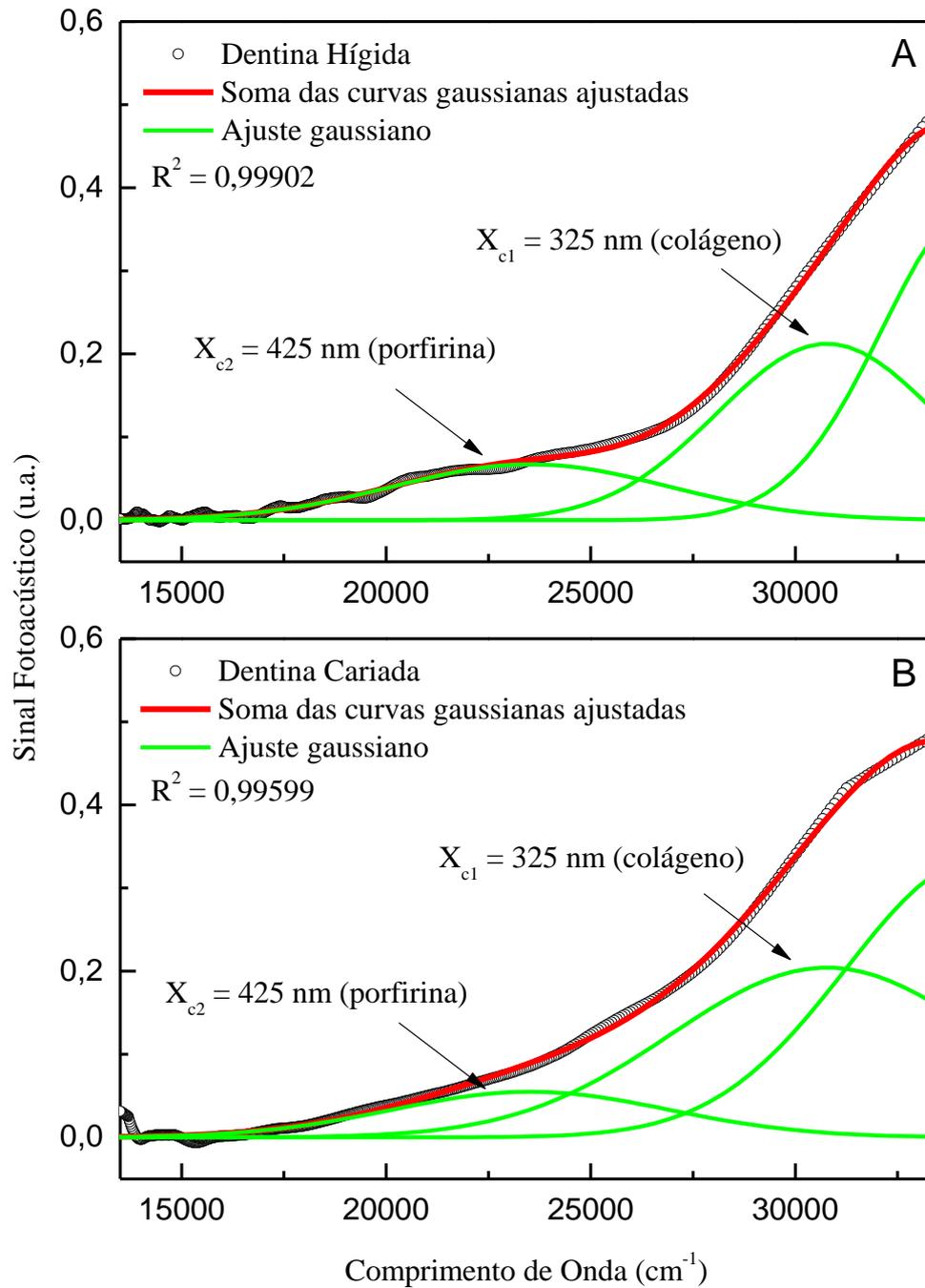
O sinal fotoacústico de cada dentina foi ajustado com curvas gaussianas para podermos obter possíveis variações dos componentes das amostras que estão sobrepostas nos espectros. Na deconvolução gaussiana os parâmetros ajustáveis são o centro, a largura e a área da banda das bandas existentes no espectro de interesse. A função gaussiana é dada por:

$$y = y_0 + \frac{A}{\omega\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{\omega^2}} \quad (7)$$

Sendo  $y_0$  é o valor inicial “*offset*”,  $\omega$  é a largura,  $A$  é a área e  $x_c$  é o centro da banda ajustada.

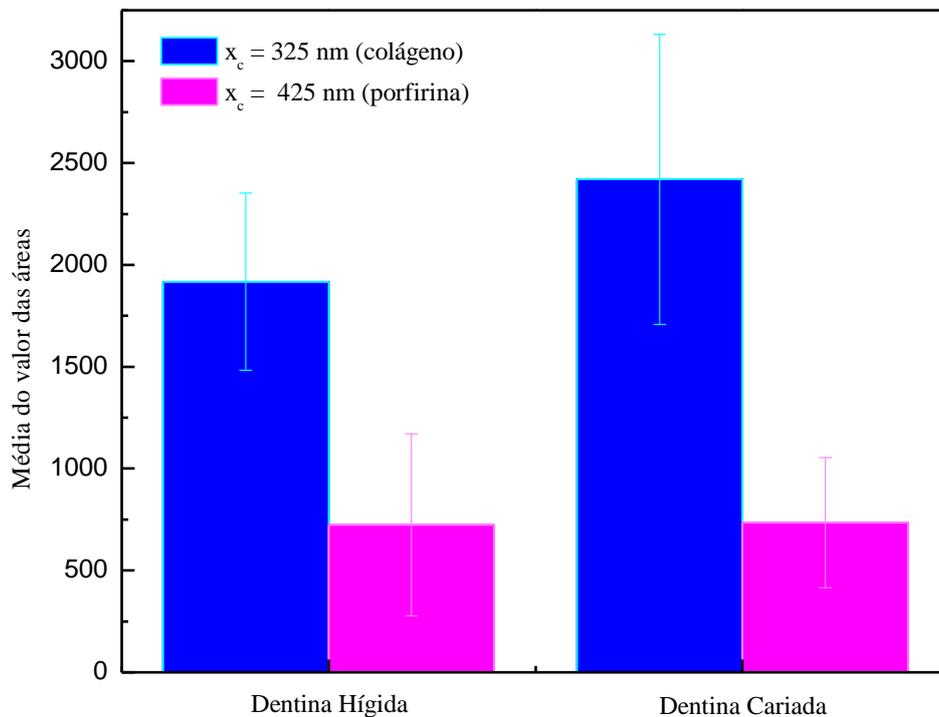
Este tratamento matemático foi feito fixando os centros das bandas, de acordo com dados obtidos na literatura [25], e permanecendo a largura e a área como parâmetros ajustáveis. Dentre os componentes encontrados na dentina hígida, optou-se por centralizar este estudo nas bandas centradas em torno de 325 e 425 nm, que são atribuídas ao colágeno e a porfirina, respectivamente [25]. A análise principal deste estudo é estudar os processos envolvidos na matriz orgânica e mineral da dentina com indução de lesão de cárie, sendo assim avaliar o colágeno é de grande importância, pois este é o componente orgânico predominante na dentina. Já a porfirina, banda adjacente ao colágeno, não foi avaliada neste estudo, entretanto seu ajuste por meio das gaussianas foi necessário para avaliar sua contribuição na banda do colágeno. A contribuição da porção inorgânica da dentina, entre 300 a 800 nm, é insignificante comparada a porção orgânica na mesma região.

Para fazer os ajustes do sinal fotoacústico, o comprimento de onda de todos os espectros foram convertidos para  $\text{cm}^{-1}$ , visto que, os espectros fornecem elementos importantes no estudo das bandas de energia de um dado elemento. Este procedimento foi feito para todos os dentes utilizados neste trabalho.



**Figura 27:** (A) Sinal fotoacústico da amostra de dentina hígida ajustada com curvas gaussianas. (B) Sinal fotoacústico da amostra de dentina cariada ajustada com curvas gaussianas.

A média das áreas das dentina hígidas e cariadas das bandas centradas em 325 e 425 nm, obtidas por ajuste gaussiano, das 10 amostras analisadas estão representadas na Fig 28. Comparando a média das áreas para a banda centrada em 325 nm nota-se uma tendência de aumento para a dentina cariada, banda atribuída ao colágeno. Com relação a banda centrada em 425 nm, atribuída a porfirina, não é possível verificar nenhuma tendência de comportamento ao comparar as dentinas hígidas e cariadas. Lembrando que um dente deu origem a dois blocos de dentina, sendo um mantido como controle e o outro submetido ao processo de indução de lesão de cárie. Foi adotada a média das áreas das gaussianas ajustadas devido à variabilidade biológica das dentinas utilizadas, mesmo utilizando dentinas provenientes de dentes de idades próximas e na mesma posição com relação à arcada óssea e submetidos a mesma condição de estocagem e processo de lesão de cárie.



**Figura 28:** Média do valor das áreas das gaussianas do colágeno (em azul,  $n=10$ ) e da porfirina (em magenta,  $n=10$ ) comparando a dentina hígida e cariada.

A espectroscopia fotoacústica também fornece análises com relação à fase do sinal fotoacústico, o método de separação de fase é uma maneira de isolar espectros fotoacústicos de camadas superpostas, cada qual com um espectro de absorção distinto, usando o fato de que o sinal de cada camada tem uma fase diferente. Ou seja, como cada um desses centros absorvem em comprimentos de onda distintos, resultará em intervalos de tempo diferentes para absorver a radiação incidente e gerar calor, fornecendo assim sinais fotoacústicos com fases distintas [62, 63].

Foi realizado o método de separação de fase para as bandas com centro em 325 e 425 nm e a diferença de fase entre elas para as dentinas híginas e cariadas, a Tabela 3 mostra média dos valores para a fase em cada comprimento de onda e a diferença de fase entre elas para a dentina hígida e cariada, as fases  $\Phi_1$  e  $\Phi_2$  indicam a fase no comprimento de em 325 e 425 nm, respectivamente, e  $\Psi_{12}$  representa a diferença de fase entre  $\Phi_1$  e  $\Phi_2$ .

Nota-se que para a dentina cariada a fase para da banda em 325 nm é menor, em média, do que a fase para a dentina hígida no mesmo comprimento de onda, isso pode indicar que o valor médio da espessura que contribuí para o sinal fotoacústico com a indução da lesão de cárie é mais superficial, ou seja, mais próximo da superfície na qual a luz incide.

Uma possível explicação seria que na dentina hígida a contribuição mineral é maior, assim os cristais de hidroxiapatita, opticamente transparentes para a fotoacústica, espalham a luz incidente e assim o calor gerado em camadas mais internas da dentina hígida demora mais a se propagar até a superfície que a luz incide, assim a fase do sinal fotoacústico é maior para dentina hígida, pois o calor demora mais tempo para se propagar, e ainda como a luz é mais espalhada na dentina hígida devido aos cristais de hidroxiapatita a intensidade do sinal fotoacústico é menor com relação a dentina cariada.

Do ponto de vista da dentina cariada, a desmineralização devido à indução de lesão de cárie diminui a quantidade de cristais de hidroxiapatita, diminuindo também a quantidade de luz espalhada na dentina, e o calor gerado se propaga mais rapidamente até a superfície na qual a luz incide, diminuindo a fase da banda em 325 nm. Com menos luz espalhada, a luz incidente atinge de forma mais direta os componentes orgânicos da dentina, tal como o colágeno, aumentando também o sinal fotoacústico. Lembrando que a predominância do sinal fotoacústico da dentina é orgânica.

Os valores médios para a fase em 325 nm são 64° e 48° e para a banda em 425 nm são 80° e 62°, dentinas híginas e cariadas, respectivamente. Nota-se que a banda em 425 nm também tem sua fase diminuída com a indução de lesão de cárie, indicando novamente que

desmineralização deixa a matriz orgânica mais exposta, entretanto não foi observado tendência de aumento na área desta banda com os ajustes gaussianos. Este dado mostra que centros absorvedores próximos, podem ser melhor analisados mediante a aplicação do método de separação de fase. De acordo com a literatura, na matriz orgânica da dentina o maior contribuinte é o colágeno, e por isso direcionamos nossas análises para a banda em 325 nm.

A diferença de fase entre a banda em 325 e 425 nm também indica a desmineralização, pois a diferença de fase para a dentina hígida tem a tendência de ser maior do que para a dentina cariada. A diferença de fase média (Tabela 3) para dentina hígida é de  $17^\circ$  e para a dentina cariada  $14^\circ$ , indicando a exposição da parte orgânica.

**Tabela 3:** Média da separação de fase para as bandas com centro em 325 e 425 nm e da diferença de fase entre elas para as dentinas híginas e cariadas

Amostra	$\overline{\Phi}_1$	$\overline{\Phi}_2$	$\overline{\Psi}_{12}$
Dentina Hígida	$(64 \pm 4)^\circ$	$(80 \pm 6)^\circ$	$(17 \pm 6)^\circ$
Dentina Cariada	$(48 \pm 5)^\circ$	$(62 \pm 6)^\circ$	$(14 \pm 3)^\circ$

De acordo com Dias e colaboradores [64], a dentina se encontra no regime termicamente grosso de 4 a 15 Hz, e a difusividade térmica varia de  $(20 - 32) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  de acordo com a idade do dente, sendo os limites de idade de 17 a 61 anos. Em nossos estudos consideramos a difusividade térmica da dentina de  $26 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ , e consideramos não variar com a cárie experimental, já que nossos resultados indicam que o processo de indução sejam iniciais. No regime termicamente grosso ( $l_s \gg \mu_s$ ), espectros resolvidos, tendem a uma absorção mais superficial para ângulos de fase próximos a  $45^\circ$ , tanto para materiais opticamente transparente ou opacos ( $l_\beta \gg \mu_s$ ), os dados da fase para as dentinas cariadas neste trabalho se aproximam do valor  $(48 \pm 5)^\circ$ , indicando também que a parte mineral contribui de forma menos significativa nas dentinas cariadas, ou seja, indicando a desmineralização da dentina. Efeitos de mudança de estrutura, como degradação do colágeno devido à indução de cárie, foram desprezados, pois as análises por espectroscopia Raman indicaram que não houve este tipo de mudança conformacional, este dados serão discutidos com maiores detalhes no texto que se segue.

Em relação ao aumento na banda atribuída ao colágeno, quando comparadas as dentinas híginas e cariadas, além da desmineralização que ocorre, não pode-se descartar uma possível contribuição do meio de indução da lesão de cárie, que contém o meio de cultura, o

inóculo da bactéria e possíveis produtos resultantes da bactéria com o meio de cultura, pois todos estes possuem bandas de absorção na mesma região espectral atribuída ao colágeno. Fusayama [60], descreveu em seu trabalho que na ausência da dentina intertubular esse espaço é preenchido por bactérias ou cristais de formas variadas que são distribuídos frouxamente. Assim, o produto da desmineralização, os restos orgânicos e as bactérias poderiam ficar depositados no interior dos túbulos.

Alguns estudos sobre dentina cariada comentam sobre degradação do colágeno no processo de cárie. Richards-Kortum [25] menciona que, variações em relação a banda de absorção do colágeno, majoritariamente do tipo I, é um indicativo de sua degradação. S. Nakornchai e colaboradores [43], por meio de análises bioquímicas, mostrou em seu trabalho que o colágeno é alterado tanto qualitativamente quanto quantitativamente em dentina cariada, o que indica sua dissociação estrutural e degradação.

As análises realizadas na banda do colágeno indicam a ocorrência de mudanças entre a dentina hígida e a que sofreu o processo de indução de lesão de cárie, porém, não é possível, nesse estudo, dizer via espectroscopia fotoacústica se houve degradação do colágeno ou apenas uma desorganização das fibras colágenas. Técnicas espectroscópicas na região do infravermelho podem fornecer essa informação com relação a mudanças moleculares dos componentes de tecidos biológicos, tais como tecidos dentários. Para investigar as possíveis mudanças moleculares associadas a degradação ou não do colágeno da dentina após indução de lesão de cárie, utilizamos a espectroscopia Raman nos fragmentos de dentinas híginas e cariadas artificialmente.

## **4.2. Estudo da Lesão de Cárie Induzida via Espectroscopia Raman**

A espectroscopia Raman, por identificar vibrações moleculares específicas induzidas por uma luz monocromática, permite a análise estrutural de amostras [2, 6]. Dentre as vantagens dessa técnica podemos citar a capacidade de fornecer informações tanto do componente mineral quanto do componente orgânico, no caso o colágeno, sem a destruição da amostra ao final das medidas. As intensidades relativas das bandas podem levar a estimativas dos constituintes das amostras [2].

A figura 29 (A) mostra os espectros obtidos para fragmentos de dentina, sendo a face pulpar direcionada para o laser, sem a aplicação de fotossensibilizador, antes e após a indução de lesão de cárie artificial. Todos os espectros foram corrigidos por linha de base e

normalizados em  $2942\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H). O pico para normalização foi escolhido de forma que não interferisse na análise da região da amida I ( $1720 - 1550\text{ cm}^{-1}$ ) e do grupamento fosfato ( $990 - 930\text{ cm}^{-1}$ ), regiões estas de interesse para análise de componentes orgânicos e inorgânicos, respectivamente. Os números indicam os principais picos identificados referentes à dentina hígida, e estão descritos na Tabela 4.

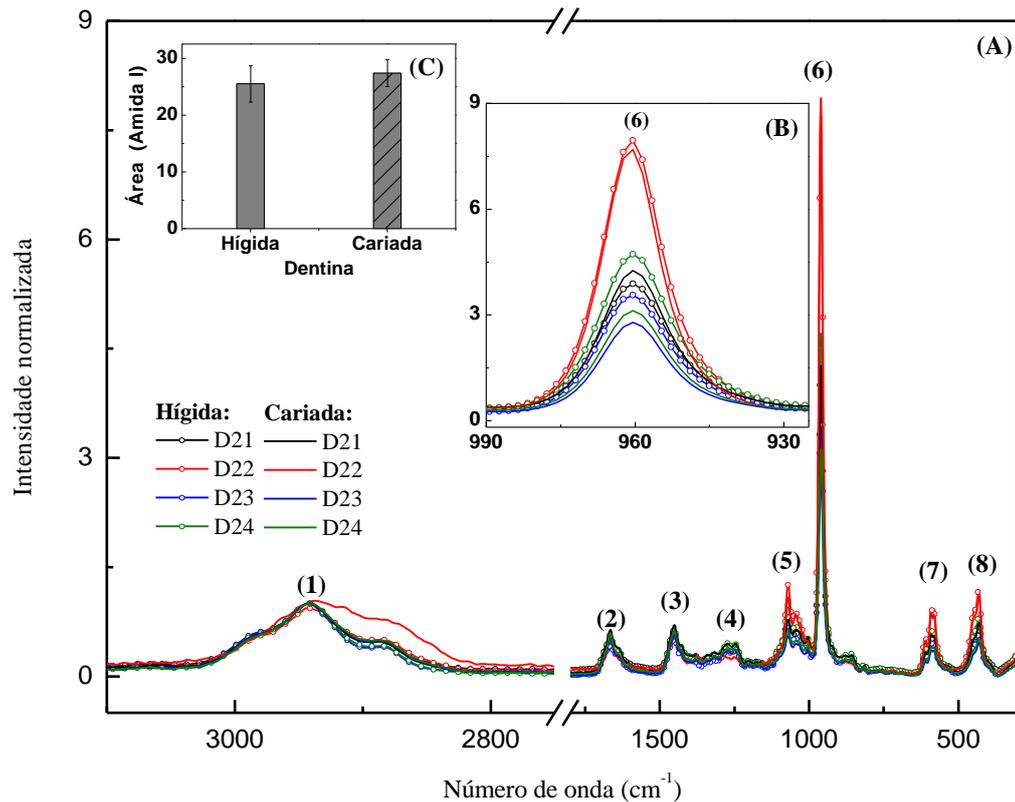
A figura 29 (B) mostra uma ampliação na banda com centro em  $961\text{ cm}^{-1}$  (pico 6), correlacionando a intensidade deste pico com processos de desmineralização na dentina após a indução de lesão de cárie. Comparando a dentina hígida (linhas e pontos) com a dentina cariada artificialmente (linhas sólidas) é possível notar uma redução na intensidade do pico em  $961\text{ cm}^{-1}$  após o processo de indução de cárie. Para o dente D21 o comportamento foi o aumento da intensidade para a dentina cariada artificialmente, o que mostra que a variabilidade biológica é um fator que influencia no método de indução artificial de cárie.

Análises com relação a possíveis alterações conformacionais na parte orgânica da dentina foram realizadas integrando toda a região da amida I ( $1720 - 1550\text{ cm}^{-1}$ ) dos espectros Raman de cada fragmento dentário, antes e após a indução de lesão de cárie, a Fig. 29 (C) mostra a média das áreas da região da amida I para as dentinas híginas e cariadas. Nota-se um pequeno aumento na área da amida I para a dentina cariada.

**Tabela 4:** Principais picos da dentina hígida e suas atribuições.

Nº do pico	Centro do pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
1	2942	$\nu(\text{CH})$
2	1665	$\nu(\text{C=O})$ : Amida I
3	1453	$\delta(\text{CH})$
4	1270	$\delta(\text{NH})$
5	1070	$\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$
6	961	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$
7	590	$\nu_4(\text{O-P-O})$
8	430	$\nu_2(\text{O-P-O})$

□ Composto orgânico; ■ Composto inorgânico;  $\nu$ : Estiramento;  $\delta$ : Deformação.

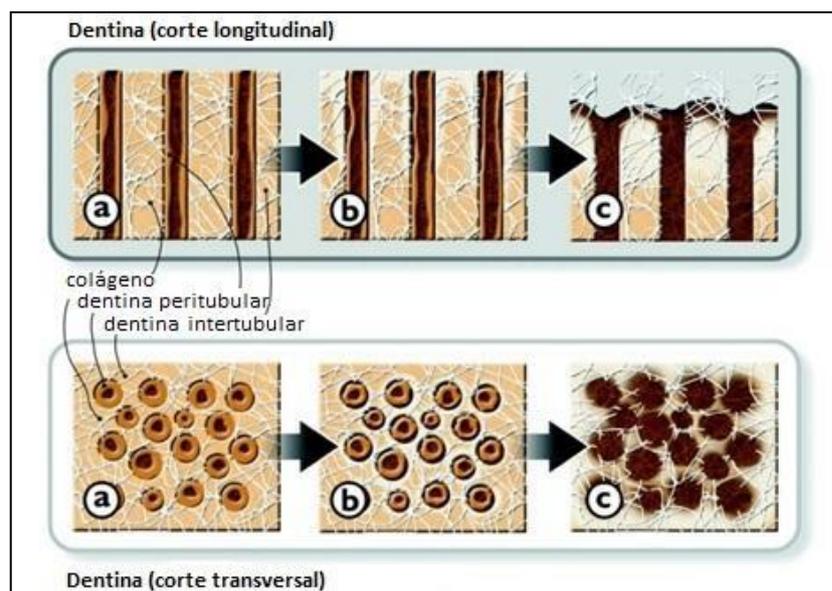


**Figura 29:** (A) espectros Raman dos fragmentos de dentina, sem aplicação de corante, antes (linha e símbolo) e após indução de lesão de cárie artificial (linha sólida), os números indicam os picos principais da dentina hígida descritos na Tabela 4. (B) Variação de intensidade do pico referente ao grupamento  $\text{PO}_4^{3-}$  representando o conteúdo mineral da dentina. (C) Média das áreas na região da amida I ( $1720 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ ), das dentinas hígidas e cariadas representando o conteúdo orgânico da dentina. Todos os espectros foram normalizados com relação ao pico (1) ( $2942 \text{ cm}^{-1}$ ) e corrigidos por uma mesma linha de base.

Na espectroscopia Raman, a matriz orgânica da dentina pode ser analisada principalmente pela amida I ( $1665 \text{ cm}^{-1}$ ), amida III ( $1270 \text{ cm}^{-1}$ ) e estiramentos e deformações do  $-\text{CH}$ , região de entre  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  e  $1500 - 1360 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [65]. A região da amida I é característica do conteúdo proteico do material analisado, na dentina pode ser correlacionado ao colágeno, e os grupamentos  $-\text{CH}$  são de natureza lipídica. Já a parte mineral é analisada pelos grupamentos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), pertencentes aos cristais de hidroxiapatita, sendo o pico mais evidente referente ao estiramento P-O-P em  $961 \text{ cm}^{-1}$ .

A diminuição da intensidade do pico centrado em  $961 \text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo fosfato indica uma desmineralização na dentina que passou pelo processo de cárie artificial. A

parte hipermineralizada da dentina (dentina peritubular) compõe as paredes que abrigam os prolongamentos odontoblásticos e a parte hipomineralizada (dentina intertubular) são os espaços entre os cristais de hidroxiapatita, nesta parte também existem as fibras colágenas, originadas dos prolongamentos odontoblásticos, chamadas também de colágeno mineralizado. A Figura 30 mostra a localização das dentinas peritubular e intertubular e das fibras colágenas e um esquema progressivo do processo de desmineralização da dentina. Estes espaços entre os cristais são mais susceptíveis à cárie e bactérias cariogênicas que destroem o colágeno e assim os cristais desmoronam causando a desmineralização da dentina [66].



**Figura 30:** Esquemas do processo de desmineralização da dentina em cortes longitudinal e transversal. (A) dentina hígida; (B) processo inicial de desmineralização; (C) dentina desmineralizada [65].

Análises realizadas na banda da amida I podem indicar mudanças conformacionais do conteúdo protéico do material analisado. As proteínas são compostos orgânicos complexos que consistem em um arranjo linear de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, que se enovelam em estruturas tridimensionais, havendo quatro conformações distintas em sua estrutura, chamadas de estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Estas estruturas se discriminam na disposição espacial da cadeia de aminoácidos da proteína que vai desde uma simetria planar (primária) até um estado enovelado (terciária e quaternária). A função de uma proteína depende de sua conformação. Transições entre as estruturas são chamadas de mudanças conformacionais, que podem mudar a função da proteína ou até mesmo desativá-la chamada de desnaturação da proteína. Essas mudanças

conformacionais podem ser analisadas em espectros Raman, principalmente na região da amida I, sendo avaliadas alterações de intensidade e largura ou aparecimento/desaparecimento de novas bandas.

A cárie em um estágio avançado pode provocar mudanças conformacionais em sua proteína mais abundante na dentina, o colágeno. O colágeno presente na dentina é majoritariamente do tipo I, apresentando duas cadeias polipeptídicas idênticas, constituídas majoritariamente por resíduos de glicina (33%), prolina (13%) e aminoácidos derivados da prolina (~10%) [23].

De acordo com Xu e colaboradores [68], é possível analisar mudanças conformacionais na estrutura do colágeno avaliando o comportamento da razão entre a intensidade dos picos centrados em 1660 e 1690  $\text{cm}^{-1}$  (1660/1690), região da amida I. No trabalho de Xu a comparação entre dentina hígida e cariada mostra que a razão decresce para a dentina cariada, indicando processos de desnaturação e modificação da matriz colágena. Em nosso trabalho esta mesma razão foi calculada, após deconvolução gaussiana na região da amida I, tendendo a um aumento para a dentina cariada artificialmente, sendo a média das razões das intensidades para a dentina hígida de  $(1,8 \pm 0,2)$  e para dentina cariada  $(2,4 \pm 0,3)$ . Assim o processo de lesão de cárie apresentada em nosso trabalho não atingiu a fase de desnaturação do colágeno, podendo ter ocorrido apenas uma sutil desorganização nas fibras colágenas da dentina sem mudanças conformacionais detectáveis pela espectroscopia Raman. Esta razão é chamada de razão de ligação cruzada, no colágeno da dentina as ligações cruzadas são ligações intermoleculares entre moléculas de colágeno que atribuí à dentina tenacidade, resiliência e resistência térmica, mecânica e química. O decréscimo desta razão indica a diminuição nas ligações cruzadas e degradação do colágeno, sendo assim o aumento nesta razão em nosso trabalho, pode apenas ser um indicativo de aumento em toda região da amida I.

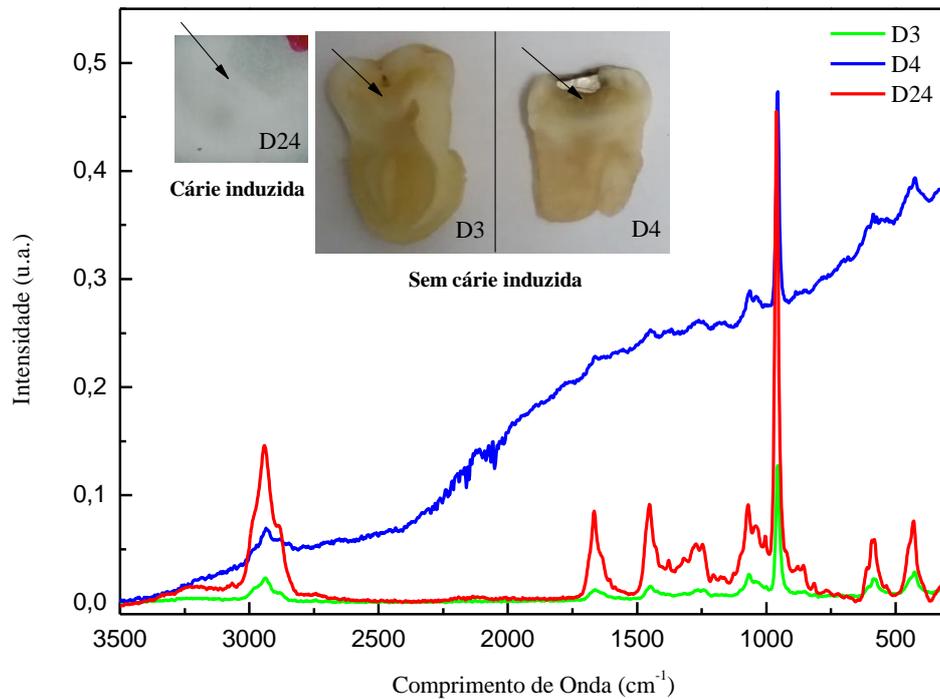
Diante deste resultado calculamos a área total da região da amida I (1720 – 1550  $\text{cm}^{-1}$ ) por integração para cada fragmento dentário e obtivemos uma média das áreas para a dentina hígida e cariada artificialmente (Fig. 29 (C)). A Fig. 29 (C) mostra um aumento para banda da amida I após a indução de lesão de cárie artificial, este comportamento pode indicar a exposição da matriz orgânica dentinária devido à desmineralização [65], como visto na diminuição do pico de 961  $\text{cm}^{-1}$  que, então levariam à degradação do colágeno e demais componentes da matriz orgânica dentinária em um estágio mais avançado da lesão de cárie.

Os resultados via espectroscopia Raman corroboram com os dados obtidos por espectroscopia fotoacústica na região do ultravioleta visível, na qual a banda referente ao colágeno da dentina também tem área maior para o dentina cariada quando comparada a dentina hígida.

Como a razão de ligação cruzada calculada pelas bandas obtidas por Raman, não indicaram mudança conformacional, o colágeno da matriz orgânica para a dentina cariada e hígida mantiveram estruturas semelhantes, e ainda com a fraca desmineralização na dentina cariada.

Outra informação relevante que pode ser obtida por espectroscopia Raman na avaliação do processo de cárie em dentina é a observação do aumento de luminescência nos espectros, mantendo as mesmas condições experimentais para todas as amostras. As dentinas em processo de cárie mais aguda apresentam maior luminescência do que processos iniciais de cárie. Em nosso estudo os espectros da dentina cariada artificialmente apresentaram baixa luminescência, indicando novamente um processo inicial da lesão de cárie induzida.

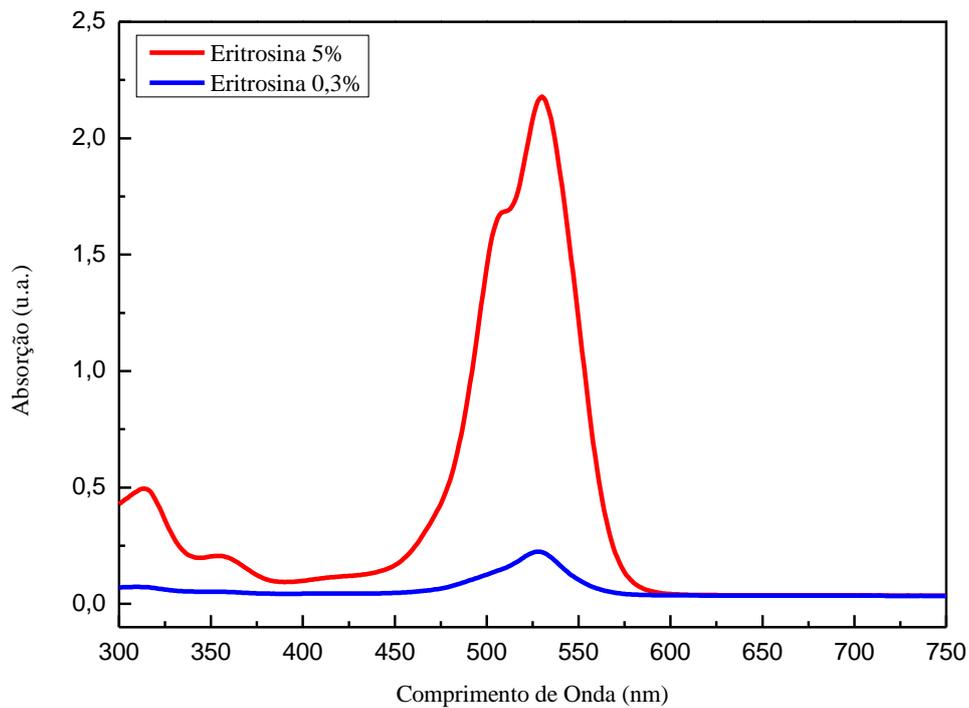
A Figura 31 mostra espectros Raman de dentina cariada sem indução comparada à dentina com indução de cárie artificial. No detalhe da Fig. 31 está mostrado uma foto comparativa de uma dentina com lesão de cárie induzida e outra dentina cariada sem indução. Nota-se que o espectro com maior luminescência localiza-se na dentina cariada mais escura, enquanto que os espectros das demais dentinas cariadas sem indução tem luminescência semelhante aos espectros das dentinas com indução de cárie artificial. O aumento da luminescência na dentina está associado a exposição da matriz orgânica. Neste estudo a presença da luminescência via espectroscopia Raman foi utilizada como uma análise qualitativa da dentina com indução de lesão de cárie, mas de maneira geral, o aumento da luminescência na espectroscopia Raman é um fator complicador, pois há sobreposição do efeito de espalhamento Raman com o de luminescência.



**Figura 31:** Espectros Raman de dentina cariada sendo D3 e D4 sem indução de lesão de cárie artificial e D24 com indução de lesão de cárie artificial. As fotos indicam as posições na dentina onde foram realizadas as medidas. Os espectros não têm correção de linha de base.

### 4.3. Estudo da Permeação de Fotossensibilizador em Dentina com Lesão de Cárie Induzida

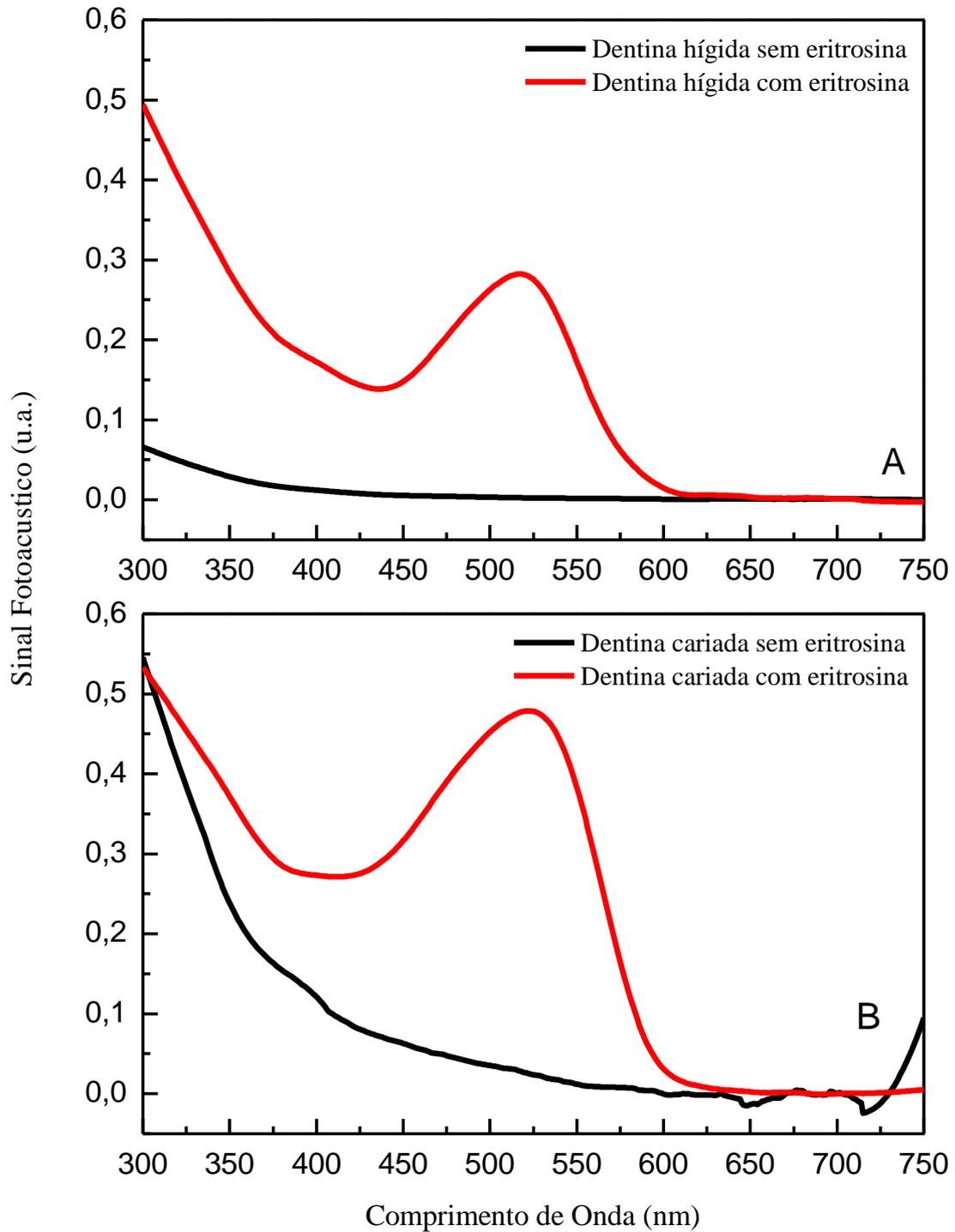
Este estudo completo está descrito na dissertação de mestrado de Ingrid Gomes Perez Occhi [9], o qual teve como objetivo principal avaliar a profundidade de penetração do fotossensibilizador eritrosina (Fig. 32) em dentina hígida e com lesão de cárie induzida, *in vitro*, por meio da técnica de espectroscopia fotoacústica.



**Figura 32:** Espectros de absorção da eritrosina a 5 % (vermelho) e eritrosina a 0,3 % (azul).

A preparação dos fragmentos dentários, procedimentos para a realização das medidas de espectroscopia fotoacústica e aplicação da eritrosina, nas concentrações de 0,3 e 5%, nas amostras hígidas e com lesão de cárie induzida estão descritos na seção de materiais e métodos. Foi utilizado duas concentrações diferentes para analisar o efeito de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores sobre a permeabilidade dentinária.

A Figura 33 (A) mostra os espectros da dentina hígida com e sem aplicação da eritrosina e a Fig. 33 (B) mostra os espectros da dentina com indução de lesão de cárie, também, com e sem aplicação do fotossensibilizador, obtidos na face pulpar. Nota-se a presença da banda de absorção do corante nos espectros da dentina hígida e cariada com centro em 526 nm. Para as medidas de permeação, os fragmentos com aplicação do corante tinham a face pulpar direcionada para a luz incidente, desta maneira a face oclusal, na qual foi feita aplicação da eritrosina, estava direcionada oposta a luz incidente. Esse procedimento é adotado para medidas de permeação a fim da técnica detectar o corante na face oposta a aplicação da eritrosina.



**Figura 33:** Sinal fotoacústico da face pulpar com e sem aplicação de eritrosina ( $3 \times 10^{-7}$  M (0,3%)): (A) dentina hígida e (B) dentina com lesão de cárie induzida.

Quando não era possível detectar a eritrosina na face pulpar o bloco era lixado e era feita a leitura novamente, foi repetido este processo até conseguir detectar o corante. A modulação da luz incidente na face oclusal foi de 16 Hz e na face pulpar foi de 75 Hz. A frequência de modulação da luz incidente na face pulpar foi escolhida com o objetivo de ter a maior frequência possível, com frequências maiores é possível a realização de leituras mais superficiais das amostras.

Para obter a profundidade de permeação do corante é subtraída da espessura final, que corresponde a espessura após os fragmentos serem lixados, o valor do comprimento de difusão  $\mu_s = 33 \mu\text{m}$ , calculado pela Equação (1) sendo a difusividade térmica da dentina (hígida e cariada) de  $26.10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  e a frequência de  $f = 75 \text{ Hz}$ . Foram avaliadas as dentinas híginas e cariadas artificialmente após a aplicação de eritrosina a 0,3 e 5% de concentração.

Na Tabela 5, estão os resultados dos testes de penetração da eritrosina a 0,3 e 5% nos blocos de dentina híginas e cariadas, juntamente com os valores das espessuras iniciais e finais de cada bloco. As espessuras iniciais dos blocos de dentina cariada, são as espessuras finais após o processo de indução de lesão de cárie, lembrando que nesse processo ocorre um desgaste do bloco de dentina. As espessuras finais dos blocos, são as espessuras a partir das quais foi possível detectar o corante, visto que muitos blocos precisaram ser lixados. Observa-se que não houve uma diferença significativa na profundidade de penetração da eritrosina na dentina hígida em relação a dentina com lesão de cárie induzida. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos na análise da dentina com lesão de cárie induzida por espectroscopia fotoacústica e espectroscopia Raman, que indicam uma leve desmineralização, possivelmente na região intertubular da dentina lesionada, sem degradação das fibras colágenas, sendo assim a morfologia da dentina cariada se assemelha ao da dentina hígida, não modificando significativamente o perfil de permeação mediante a aplicação da eritrosina.

**Tabela 5:** Penetração da eritrosina nas concentrações de 0,3 e 5% em dentina hígida e cariada.

Concentração de Eritrosina (%)	Condição da Dentina	Dente	Espessura Inicial do Bloco de Dentina ( $\mu\text{m}$ )	Espessura Final do Bloco de Dentina ( $\mu\text{m}$ )	Profundidade de Penetração do Corante ( $\mu\text{m}$ )	
0,3%	Hígida	1	995	180	147	
		2	990	183	150	
		3	1078	140	107	
		4	1029	1029	996	
		5	958	958	925	
	Cariada	1	961	183	150	
		2	994	150	117	
		3	943	220	187	
		4	918	209	176	
5		936	116	83		
5%	Hígida	6	977	977	944	
		7	1052	986	953	
		8	950	900	867	
		9	977	263	230	
		10	990	197	164	
	Cariada	6	887	887	854	
		7	920	920	887	
		8	979	979	946	
		9	958	244	211	
10		1007	1007	974		

As análises dos resultados, mostrados na Tabela 5, indicam que a eritrosina à 5% alcançou uma profundidade de penetração maior comparada a alcançada pela eritrosina à 0,3%, isto ocorreu tanto para a dentina hígida quanto para a cariada artificialmente. Sugere-se que a permeação pode estar diretamente relacionada a concentração de corante utilizado, quanto maior a concentração, maior a profundidade de penetração do mesmo. Com o aumento da concentração, possivelmente há um aumento densidade específica na solução de eritrosina à 5%, propiciando maior permeação na dentina.

Outros trabalhos que estudaram a permeação de corantes fotossensibilizadores, tais como, azul de toluidina, verde de malaquita, azul de metileno e a própria eritrosina em dentina hídrica [13, 69], foram realizados no GEFM em colaboração com o Departamento de Odontologia da UEM. Nestes estudos foram avaliadas o potencial de permeação dos fotossensibilizadores via espectroscopia fotoacústica, e os resultados mostraram que padronizando a idade média dos dentes, os corantes mais concentrados estudados apresentaram maior potencial de permeação comparados aos de concentração menor.

A penetração do corante é influenciada pela estrutura da dentina, foram tomados cuidados para tentar reduzir a variabilidade biológica. Neste trabalho foi selecionado apenas dentes jovens, que passaram por análise de composição orgânica e inorgânica por meio de espectroscopia Raman, para ser feita a exclusão dos dentes que não apresentassem composição semelhante aos demais.

A capacidade do corante de penetrar em dentina é uma propriedade importante em termos da atuação do corante sobre os microrganismos provenientes da cárie dentária nos túbulos da dentina. Neste trabalho, a profundidade de penetração da eritrosina em dentina foi em torno de 877  $\mu\text{m}$  no sentido oclusal-pulpar dos túbulos da dentina para a concentração de 5%. De acordo com Occhi [9] a eritrosina à 5% apresentou comportamento de permeação favorável sobre a estrutura dentinária o que viabiliza sua aplicação na superfície dentinária e utilização na terapia fotodinâmica para a descontaminação da dentina cariada, num processo coadjuvante no tratamento da cárie dentária, já que em situações de invasão bacteriana de túbulos da dentina, dependendo da espécie, do tempo de exposição e do diâmetro dos túbulos, os microrganismos podem estar presentes em até 500  $\mu\text{m}$  de distância de sua fonte de infecção sendo que para o gênero *streptococos*, a invasão aos túbulos acontece em 200  $\mu\text{m}$  de profundidade. Porém, são necessários mais estudos para analisar a relação da dentina cariada com a penetração do corante e a quantidade mínima necessária de corante para inativar as bactérias.

## 5. Conclusões

Conclui-se que a espectroscopia fotoacústica e Raman são métodos eficazes e viáveis para avaliar a resposta espectral da dentina com lesão de cárie experimental em comparação com a dentina hígida. Com os resultados obtidos as técnicas espectroscópicas empregadas neste estudo tem caráter promissor na detecção da cárie em estágio inicial, ou seja, em processos iniciais de desmineralização, no qual ainda não há desnaturação da matriz orgânica da dentina, majoritadamente composta por colágeno.

Com a espectroscopia fotoacústica foi possível avaliar as bandas relacionadas ao colágeno da dentina, na qual foi observada uma tendência de aumento da banda centrada em 325 nm devido à desmineralização causada pelo ação bacteriana no processo de lesão de cárie experimental. O aumento da banda colágeno foi associado a sua exposição devido à desmineralização da dentina intertubular, hipomineralizada. Ainda por esta técnica foi possível avaliar a fase do sinal fotoacústico, pois a banda de absorção mais intensa no espectro (entre 300 a 800 nm) da dentina tanto hígida como da cariada artificialmente, é uma composição de componentes orgânicos com bandas de absorção que sobrepõem nesta região. Com o método de separação de fase foi analisada a fase do sinal fotoacústico para cada fragmento dentário, hígido e cariado artificialmente, no comprimento de onda de 325 nm, atribuído ao colágeno da dentina, a qual mostrou um comportamento de diminuição com a lesão de cárie induzida na dentina, bem como a diferença de fase entre as bandas do colágeno e da porfirina, centrada em 425 nm, ambos os resultados indicam também a desmineralização, pois a diminuição da fase do sinal fotoacústico mostra que o calor está sendo gerado mais próximo da superfície na qual a luz é incidente. Sendo a parte mineral responsável pelo maior espalhamento da luz incidente na dentina, ao ser desmineralizada a uma maior quantidade de luz atingindo a matriz orgânica, agora mais exposta e mais próxima da superfície, levando menor tempo para gerar as ondas de pressão dentro da célula fotoacústica, e assim a fase e a diferença de fase no sinal fotoacústico decrescem com a lesão de cárie induzida.

Para investigar possíveis mudanças conformacionais do colágeno no processo de cárie induzida, foi empregada a espectroscopia Raman. Os resultados confirmaram a desmineralização detectada pela espectroscopia fotoacústica, mostrando a diminuição do pico relacionado ao fosfato, componente mais ramoso da estrutura cristalina da hidroxiapatita, parte mineral da dentina. Entretanto não foi observada nenhuma mudança conformacional, estes resultados foram obtidos calculando a razão entre bandas da região da

amida I, chamada de razão de ligação cruzada, a qual sua diminuição, comparando a dentina hígida com a cariada, indicaria possível desnaturação do colágeno, porém nossos resultados mostraram aumento dessa razão. Sendo assim, avaliamos o conteúdo proteico das dentinas integrando a área da amida I, e novamente obtivemos o aumento da área desta região, por se tratar de uma região proteica a correlacionamos com o colágeno da dentina, o componente proteico mais abundante da dentina, este resultado também corrobora com o aumento observado na fotoacústica para o mesmo componente, mostrando que a matriz orgânica ficou mais exposta mediante a desmineralização.

Para dentina com lesão de cárie experimental utilizada neste trabalho, a permeação do corante fotossensibilizador, utilizado na inativação de microorganismos no processo da cárie, não foi alterada quando comparada a dentina hígida, indicando novamente que possivelmente não houve processo intenso de desnaturação da matriz orgânica, que ocorre posterior a desmineralização intensa da dentina.

Cabe ressaltar que este estudo foi realizado *in vitro*, entretanto mostra o potencial promissor de técnicas espectroscópicas, para diagnóstico do processo de cárie inicial em futuros estudos *in vivo*, já que algumas técnicas possuem equipamentos portáteis, tais como espectromêtros FT-Raman. Ainda são necessárias mais pesquisas, *in vitro*, com relação a utilização das técnicas de espectroscopia fotoacústica e Raman para detecção da cárie, que ficam como perspectivas futuras, tais como avaliar por meio destas espectroscopias estágios iniciais e avançados da cárie, para observar processos de desnaturação proteicas, e acompanhar o processo de desmineralização da dentina intertubular e peritubular, e ainda empregar mais técnicas espectroscópicas, como por exemplo, medidas de luminescência em dentinas híidas e cariadas.

## 6. Referências

- [1] Astrath, A. C., “Espectroscopia Fotoacústica: Determinação das Taxas de Difusão de Complexos Nanoencapsulados na Pele e de Fotossensibilizadores na Dentina”, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- [2] Soares, L. E. S.; Liporoni, P. C. S.; Martin, A. A. “The effect of soft-start polymerization by second generation leds on the degree of conversion of resin composite.” *Oper. Dent.* v.32, n.2, p.155-160, 2007.
- [3] Gilchrist, F. et al. “The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel.” *Int. J. Paed. Dent.*, v.17, p.274–280, 2007.
- [4] Braga, S. R. M. et al. “Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice.” *Microsc. Res. Tech.*, v.74, n.12, p.1083-1087, 2011.
- [5] Karan, K. et al. “Chemical profile of the dentin substrate in non-cariious cervical lesions.” *Dent. Mater.*, v.25, p.1205-1212, 2009.
- [6] Xu, C.; Wang, Y. “Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited.” *Arch. Oral Biol.*, v.57, n.4, p.383-391, 2012.
- [7] Maia, A. M. A. “Avaliação de técnicas diagnósticas de lesão de cárie proximal: Raio X, transiluminação com radiação infravermelho próximo e tomografia por coerência óptica”, Dissertação de Mestrado – Programa de pós graduação em odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- [8] Nahorny, S. “Estudo, in vitro, da aplicação de nanobiomateriais na proteção contra erosão ácida na dentina”, Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, 2014

- [9] Occhi, I. G. P. “Avaliação da permeabilidade dentinária do corante de eritrosina utilizado para terapia fotodinâmica”, Dissertação de Mestrado – Programa de pós graduação em odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.
- [10] Regezi, J. A.; Sciubba, J. J., “Patologia bucal: Correlações clinicopatológicas”, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 363-386, 1991.
- [11] Araújo, N. S.; Araújo, V. C., “Patologia bucal”, São Paulo: Artes médicas, p. 73-84, 1984.
- [12] Graciano, A. X. “Estudo da permeabilidade dentinária a diferentes fotossensibilizadores empregados na terapia fotodinâmica”, Dissertação de Mestrado – Programa de pós graduação em odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- [13] Nagata, J. Y., “Estudo de diferentes corantes para aplicação em Inativação Fotodinâmica na Odontologia”, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- [14] Ubaldini A.L.M., Baesso M.L., Neto A. M., Sato F., Bento A.C., Pascotto R.C. “Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues” SAGE Publications, Journal of dental research, 0022034513488893, 2013.
- [15] Ubaldini A.L.M., Baesso M.L., Sehn E., Sato F., Benetti A. R., Pascotto R.C. “Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy study of physicochemical interaction between human dentin and etch-&-rinse adhesives in a simulated moist bond technique” International Society for Optics and Photonics, Journal of biomedical optics, 0650021-0650025, 2012.
- [16] Oliveira, B. M. B. “Interações físico-químicas entre um adesivo contendo 10-MDP e a dentina de lesões cervicais não cariosas” Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

- [17] Uchimura, J. Y. T. “Análise da variação de cor e da estrutura dos dentes submetidos ao clareamento interno” Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.
- [18] Disponível em [http://www.researchgate.net/profile/ShinyThomas4/publication/48410785\\_Spectroscopic\\_Investigation\\_of\\_Tooth\\_Caries\\_and\\_Demineralization/links/00b7d53af94d512e8f000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/ShinyThomas4/publication/48410785_Spectroscopic_Investigation_of_Tooth_Caries_and_Demineralization/links/00b7d53af94d512e8f000000.pdf). Acessado em 20 out. 2014.
- [19] Disponível em <http://www.brasile scola.com/saude-na-escola/conteudo/higiene-bucal-quimica-creme-dental.htm>. Acessado em 10 maio 2015.
- [20] Schoeder, HE. ‘Oral e Strukturbiologie. Entwicklungsgechichte, Struktyur und Funktion normaler Hart – und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks’, 5rd edicion; New York: Thieme, 2000.
- [21] Alves, F. B. T. “Influência da dentina sadia e afetada por cárie na resistência de união de sistemas adesivos e cimentos de ionômero de vidro em dentes decíduos – estudo in vitro”, Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- [22] Disponível em <http://www.forp.usp.br/restauradora/dentin.html>. Acessado em 20 out. 2014.
- [23] Pereira, J. P.; Netto, A. Camillo; Gonçalves, S. A. ‘Capítulo 2: A biologia molecular aplicada a dentística. Dentística: Uma abordagem multidisciplinar’, Artes Médicas, 331, 2014.
- [24] Richards-Kortum, R., Sevick-Muraca, E. “Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis”. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1996. 47:555–606 1996
- [25] Disponível em <http://pt.slideshare.net/rinkushanklesha9/dentin-42596121>. Acessado em 20 out. 2014.

- [26] Hill, W.; Petrou, V. "Caries detection by diode laser Raman spectroscopy", *Appl. Spectrosc*, v. 54, p. 795-799, 2000.
- [27] Ko, A. C. T.; Choo-Smith, L.P.; Hewko, M.; Leonardi, L.; Sowa, M.G.; Dong, C.C.S.; Willians, P.; Cleghorn, B. "Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy", *J. Biomed. Opt.*, v.10, 0311-18, 2005.
- [28] Jones, R. S., Huynh, G.D., Jones, G.C., Fried, D., "Near-infrared transillumination at 1310-nm for the imaging of early dental decay," *Opt. Express* 11, 2259-2265 (2003).
- [29] Bühler, C.M., Ngaotheppitak, P., Fried, D., "Imaging of occlusal dental caries (decay) with near-IR light at 1310-nm," *Proc. SPIE* 5687, 125-131 (2005).
- [30] Schneiderman, A.; Elbaum, M.; Schultz, T.; Keem, S.; Greenebaum, M.; Driller, J. "Assessment of Dental caries with Digital Imaging Fiber-Optic Transillumination (DIFOTI): in vitro study", *Caries Res*, v. 31, p. 103-110, 1997.
- [31] De Josselin De Jong, E., Sundström, F., Westerling, H., Tranaeus, S., Ten Bosch, J.J., Angmar-Månsson, B., "A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence," *Caries Res* 29, 2-7 (1995).
- [32] Stookey, G.K., Jackson, R.D., Zandona, A.G., Abaloui, M., "Dental caries diagnosis," *Dent. Clin. North Am* 43, 665-677 (1999).
- [33] Kaneko, K.; Matsuyama, K.; Nakashima, S. "Quantification of early carious enamel lesions by using an infrared camera in vitro", In *Proceedings of the 4th annual Indiana conference*, G. K. STOOKEY, ed., (Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, Indiana 1999) pp. 83-100.

- [34] Amaechi, B.T., Higham, S.M., Podoleanu, A.G., Rogers, J.A., Jackson, D.A., “Use of optical coherence tomography for assessment of dental caries: quantitative procedure,” *J. Oral Rehabil* 28, 1092-1093 (2001).
- [35] Farrell TJ, Patterson MS, Wilson B. ‘A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties in vivo’, *Med Phys* 1992; 19: 879-888.
- [36] Weersink RA, Hayward JE, Diamond KR, Patterson MS: “Accuracy of noninvasive in vivo measurements of photosensitizer uptake based on a diffusion model of reflectance spectroscopy”, *Photochem Photobiol* 1997; 66: 326-335.
- [37] Uzunov T.T., Borisova E.G., Kamburova K.P., Avramov L.A. “Reflectance spectroscopy of human teeth in vitro.” BPU-5: Fifth General conference of the Balkan Physical Union SP16-003 1775-1778, 2003.
- [38] Nichols M.G., Hull E.L., Foster T.H. “Design and testing of a white-light, steady-state diffuse reflectance spectrometer for determination of optical properties of highly scattering systems.” *Appl. Opt.* 1997; 36(1): 93–104.
- [39] Zonios G., Perelman L., Backman V., Manoharan R., Fitzmaurice M., Van Dam J., Feld M.S. “Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo.” *Appl Opt* 1999; 38: 6628-6637.
- [40] Utzinger U., Brewer M., Silva E., Gershenson D., Bast R.C. Jr, Follen, Richards Kortum R. “Reflectance spectroscopy for in vivo characterization of ovarian tissue.” *Lasers Surg Med* 2001; 28(1): 56–66.
- [41] Borisova E., Uzunov T., Valkanov S., Avramov L. “Light diffuse reflectance for detection and differentiation of teeth caries lesions.” *SPIE Proc.* 2007; 6535.

- [42] Fusayama T. “Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment.” *Oper Dent.* 1979;4(2):63-70.
- [43] Nakornchai S., Atsawasuwan P., Kitamura E., Surarit R., Yamauchi M. “Partial biochemical characterisation of collagen in carious dentin of human primary teeth.” *Arch Oral Biol.* 2004;49:267–73
- [44] Pinheiro S.L., Frasson A.D., Bincelli I.N., Barros P.P., Silva G.H. “Study of a Morphometric Model for Histological Evaluation of the Collagen in Dentin Carious Lesions.” *J Clin Pediatr Dent.* 2008;33(2):37–40.
- [45] Erhardt M.C., Osorio R., Toledano, M. “Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin.” *J Dent.* 2008a;36:1068-73.
- [46] Nuglisch, L. E., “Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação e a distribuição de medicamentos na unha humana”, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.
- [47] Sehn, E, ‘Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele’, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- [48] Rosencwaig, A. “Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy, University of California”, Vol. 57, 1980.
- [49] Marquerinit M. V., Cellat N., Mansanarest A. M., Vargast H. and Miranda S. L. C. “Open photoacoustic cell spectroscopy.” *Meas. Sci. Technol.* 2 396401. Printed in the UK, 1991
- [50] Rosencwaig “Photoacoustic spectroscopy of biological materials.” *A.Science*, Vol.181(4100), pp.657-658, 1973

[51] Pedrochi, F., “Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica”, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

[52] Rosa D. T. D. F. “Caracterização óptica e térmica de materiais poliméricos via métodos fototérmicos.” Tese de doutorado, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

[53] Sala, O. “Uma molécula Didática”, Química Nova, 31, 1-3, 2008.

[54] SOARES L. E. S. S. “Aplicações da Espectroscopia Raman em Dentística” Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

[55] Hofelmann K. C. G. “Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H)” Dissertação de Mestrado; Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2013

[56] Guimarães, C. “Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona” Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Física, Cuiabá, 2011

[57] Disponível em <http://www.raman.de/htmlEN/basics/intensityEng.html> Acessado em 19 abril 2015.

[58] Millen, R. P., Faria, D. L. A., Temperini, L. A. “Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados” Química Nova, vol.28 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2005

[59] Mulati A. C. N., “Fundamentos da Espectroscopia Vibracional: Modelos clássico e quântico para moléculas diatômicas” Universidade Estadual de Maringá, Pós Graduação em Física, Exame de Qualificação, outubro de 2014;

- [60] Sala O., "Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho", 2 ed, Editora Unesp, 274 pp, 2008
- [61] Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown C. W. "Introductory Raman spectroscopy" Elsevier, 434 p, 2003.
- [62] Jr Pessoa O. "Aplicações de medidas de fase do efeito fotoacústico." Tese de doutorado, Instituto de física gleb wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.
- [63] Novatski A. "Preparação e caracterização do vidro alumino silicato de cálcio dopado com TiO<sub>2</sub>" Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- [64] A. P. N. Carvalho, D. T. Dias, V. C. Bedeschi, O. Nakamura, and M. Q. Oliveira " In vitro thermal diffusivity measurements as aging process study in human tooth hard Tissues" Journal of Applied Physics 114, 194705; doi: 10.1063/1.4832481, 2013.
- [65] Matousek, P. e Morris, M. D. "Capítulo 11: Emergin dental applications of Raman spectroscopy. Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical", Springer, 469, 2010.
- [66] Zoli, A. F. A. e Neto, P. J. "Evidenciador de cárie dentária", Semina. 19(Ed. especial), 31-36, 1998.
- [67] Disponível em <http://www.scielo.br/img/revistas/jaos/v17n2/01f7.gif> Acessado em 20 out. 2014.
- [68] Xu, C.; Karan, K.; Yao, X.; Wang, Y. "Molecular structural analysis of noncarious cervical dentin using Raman spectroscopy", J. Raman Spectrosc., 40, 1780-1785, 2009.
- [69] Nogueira A.C., Graciano A.X., Nagata J.Y., Fujimaki M., Terada R.S.S., Bento A.C., Astrath N.G.C., Baesso M.L. "Photosensitizer and light diffusion through dentin in photodynamic therapy". Journal of Biomedical Optics. 2013; 8: 055004

[70] Disponível em  
<http://www.uff.br/fisicoquimica/docentes/katialeal/didatico/Capitulo4.pdf> Acessado em 20  
out. 2014.

## Anexo 1 - Parecer do comitê de ética.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DE CORANTES E DA LUZ HALÓGENA UTILIZADAS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

**Pesquisador:** Mitsue Fujimaki Hayacibara

**Área Temática:** Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 1

**CAAE:** 14398113.2.0000.0104

**Instituição Proponente:** Núcleo/Incubadora Unitrabalho

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 448.028

**Data da Relatoria:** 07/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa com finalidade acadêmica, sob orientação da pesquisadora supra-identificada.

#### Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos primários da pesquisa são: (1) avaliar in vitro a profundidade de penetração da eritrosina e do rosa de bengala em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica e, (2) avaliar in vitro a profundidade de penetração de luz halógena em dentina.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão submetidos os sujeitos da pesquisa serão suportados pelos benefícios apontados.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta seus objetivos, hipóteses e metodologia de forma clara e concisa. Trata-se de um estudo in vitro no qual serão utilizados dentes humanos e dentes bovinos para a avaliação da permeabilidade de corantes e da luz halógena utilizados na terapia fotodinâmica. Inicialmente será realizado um estudo piloto para uma avaliação inicial da permeabilidade dentinária. Está previsto o

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG  
**Bairro:** Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900  
**UF:** PR **Município:** MARINGÁ  
**Telefone:** (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br

*Handwritten signature*



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 448.028

uso de 44 amostras de dentes humanos, fornecidas pelo Banco de Dentes da UEM. O orçamento apresentado é de R\$ 28,00, para itens de custeio, com indicação de financiamento próprio.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Anexados ao projeto de pesquisa, encontram-se: Folha de rosto, devidamente assinada pela pesquisadora responsável e pelo responsável institucional (chefe do departamento de Odontologia); Declaração do Banco de dentes Humanos da UEM, assegurando o fornecimento das amostras necessárias para a pesquisa; Pedido de dispensa de apresentação de TCLE, cuja justificativa considera-se adequada e suficiente.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela.

MARINGÁ, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:  
**Ricardo Cesar Gardiolo**  
(Coordenador)

Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética e Biossegurança  
Michelli Siferreira de Brito Carvalho

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG  
Bairro: Jardim Universitário CEP: 87.020-900  
UF: PR Município: MARINGÁ  
Telefone: (44)3011-4444 Fax: (44)3011-4518 E-mail: copep@uem.br