

ESTUDO DOS COMPONENTES DA DENTINA HUMANA POR DIFERENTES SISTEMAS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

Anderson de Oliveira Lobo¹, **Tatiana S. da S. C. Guimarães**², **Renata M. de Carvalho**², **Luís Eduardo Silva Soares**³, **Evaldo José Corat**⁴, **Airton Abrahão Martin**⁵

¹Bolsista CNPq PIBIC-INPE / Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, anderson@univap.br.

²Universidade do Vale do Paraíba / Faculdade de Odontologia, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, tatisuckow@hotmail.com.

³Universidade do Vale do Paraíba / Faculdade de Odontologia / Laboratório de espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, lesoares@univap.br.

⁴Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais-INPE, Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS), Av. dos Astronautas, 1758. Jd. da Granja, São José dos Campos, SP, Brasil, corat@las.inpe.br.

⁵Universidade do Vale do Paraíba / Coordenador do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, amartin@univap.br.

Palavras-chave: Dentina, espectroscopia Raman, FT-Raman.

Área do Conhecimento: III – Engenharias

Resumo - Os dentes humanos são compostos basicamente de esmalte e dentina. A dentina é um tecido mineralizado que forma o corpo do dente, quimicamente é composta de 70% de material inorgânico, 18% de matéria orgânica e 12% de água. A porção inorgânica é composta basicamente de cristais de Hidroxiapatita, e fosfatos de cálcio amorfos. A espectroscopia Raman consegue identificar os modos vibracionais destes compostos (PO_4^{3-} , OH^- , HPO_4^{2-} e CO_3^{2-}), sendo que um dos problemas que apresenta é a radiação da fluorescência, fenômeno relacionado a níveis de energia das camadas eletrônicas das moléculas. O objetivo deste trabalho foi estudar os componentes da dentina utilizando a espectroscopia Raman dispersiva e FT-Raman. Para a realização deste trabalho utilizaram-se três sistemas Raman (514.5, 785 e 1064nm) e 12 dentes humanos terceiros molares erupcionados e hígidos. Os espectros obtidos apresentaram-se diferenciados, observando uma alta radiação de fluorescência nos sistemas 514.5 e 785 nm. O sistema FT-Raman identificou com maior resolução a presença de bandas relacionadas ao componente fosfato e hidroxiapatita.

Introdução

Os dentes humanos são compostos basicamente de esmalte e dentina, sendo considerados materiais orgânicos e inorgânicos respectivamente. A Dentina é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva, que forma o corpo do dente, sendo recoberta pelo esmalte na porção coronária e pelo cimento na porção radicular. Aloja em seu interior a polpa com a qual está intimamente relacionada [1]. Configura um dos tecidos mais duros do organismo sendo, porém menos mineralizado que o esmalte, apresenta considerável elasticidade, devido ao arranjo em rede de suas fibras colágenas, o que permite a absorção de forças mastigatórias [2].

Quimicamente a Dentina é composta por cerca de 70% de material inorgânico, 18% de matéria orgânica e 12% de água, embora esta composição varie devido à deposição contínua e progressiva de minerais após a formação e erupção do dente. A porção inorgânica constitui-se principalmente de cristais de Hidroxiapatita sendo que, cada cristal é composto por milhares de unidades moleculares tendo como fórmula

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Estão também presentes fosfatos de cálcio amorfos em maior quantidade no tecido recém-formado do que no tecido maduro ou velho, além de pequenas quantidades de carbonatos, sulfatos e elementos como flúor, cobre, zinco e ferro. A porção orgânica consiste principalmente de fibras colágenas (93%) dispostas em pequenos feixes, que por sua vez são unidos por substâncias amorfas de natureza glicoproteica, tais como, lipídeos, glicosaminoglicanas e compostos não identificados de proteína [3]. O estudo da dentina e de seus componentes, ou mesmo fatores que podem alterá-los é de significativa importância, uma vez que, a patogenia da cárie se dá com maior intensidade neste tecido que se apresenta mais susceptível a desmineralização em meio ácido. E também, para reverter quadros de hipersensibilidade dentinária que provocam sensação dolorosa manifestada em número considerável de pessoas decorrente da movimentação de fluidos no interior dos túbulos dentinários estimulando as fibras nervosas.

A maioria dos biominerais contendo carbonatos é também influenciada por cristais

biológicos. Desta forma se torna interessante o estudo da composição e estruturação desses biominerais [4-5]. A substituição de dois tipos de carbonatos é descrita como componentes sintéticos: tipo A (OH^- substituído por CO_3^{2-}) e tipo B (PO_4^{3-} substituído por CO_3^{2-}). Previamente estudos envolvendo espectroscopia Raman em carbonatos reportaram discrepâncias em números de bandas relacionadas ao PO_4^{3-} . Apesar destas discrepâncias, duas bandas consistentemente foram evidenciadas em 1070 cm^{-1} (tipo A) e em 1046 cm^{-1} (tipo B), sendo estas presentes na dentina [6]. Encontram-se presentes na dentina 5 a 8% de carbonatos distribuídos em tipo A e B, embora o tipo B se encontre em maior espécime. A existência de íons HPO_4^{2-} , íons de fosfato, carbonato e fosfatos de cálcio foram também estabelecidos [7-9].

A espectroscopia Raman, por estar relacionada a vibrações de ligações moleculares, consegue identificar os modos vibracionais dos compostos PO_4^{3-} , OH^- , HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} . Um dos problemas para o estudo de dentina por espectroscopia Raman é alta radiação de fluorescência, relacionada a vibrações de componentes orgânicos. Pelo fato da presença desta radiação, utilizam-se comprimentos de ondas de excitação maiores, aproximando da região do infravermelho.

Pensando na importância deste estudo, o objetivo deste trabalho foi observar os componentes principais da dentina, com a espectroscopia Raman, mostrando as diferenças e limitações de cada técnica para melhor compreensão das vibrações moleculares das estruturas presentes na dentina humana.

Materiais e Métodos

Preparação das amostras

Os dentes utilizados neste estudo foram obtidos de doze dentes terceiros molares humanos erupcionados e hígidos. Todos os dentes foram extraídos de pacientes que necessitavam de extrações como parte de seu tratamento na clínica Odontológica da Universidade do Vale do Paraíba. O protocolo para extração dos dentes e o termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da UniVap. Os dentes foram limpos e armazenados em solução aquosa de Timol a 0,1% até o momento do uso. Para preparar as amostras de dentina, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas para remover os traços de Timol. Em seguida, os dentes foram seccionados na altura do terço oclusal com o auxílio de um disco diamantado montado em uma máquina de corte (Isomet 1000 - BUEHLER) com uma velocidade de 250rpm e

um peso de 100g [10]. A superfície exposta da dentina foi então polida por 1 minuto com uma lixa d'água (n° 600 - 3M) em uma politriz (Knuth Rotor – Struers) com refrigeração constante para produzir uma camada de *smear layer* padrão [11]. Os dentes foram lavados em água destilada em um aparelho de ultra-som (Cole - Parmer 8891) por 5 minutos para remover os resíduos. Os dentes foram novamente seccionados, produzindo discos de dentina com uma espessura de 4mm [10].

Instrumentação Raman

Micro-Raman dispersivo visível 514 nm

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologias Especiais do Instituto de Pesquisas Especiais Utilizou-se o equipamento fabricado pela Renishaw, modelo 2000, com um laser de Argônio para a excitação. Como ajuste do equipamento, focou-se o feixe laser com o auxílio do microscópio com um aumento de 500 vezes, posicionou-se a chave de potência a um filtro de 0,3 e coletaram-se espectros em três pontos por amostra. Como parâmetros para a aquisição as grades de dispersão foram centralizadas a 1500cm^{-1} por um tempo de exposição de 30 segundos com cinco acumulações, totalizando aproximadamente 3 minutos por espectro coletado.

Raman dispersivo no infravermelho próximo 785 nm

O experimento foi realizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, da Universidade do Vale do Paraíba, no Laboratório de Espectroscopia Biomolecular. O equipamento utilizado possui um laser de Argônio de 5W (Spectra Physics Modelo 2017 - 514,5nm) bombeando um laser de estado sólido de Titânio Safira (Spectra Physics Modelo 3900S), sintonizado no comprimento de onda de 785nm na região do infravermelho próximo (Figura 1). O sistema é montado sobre uma mesa óptica. Como parâmetros para a coleta dos espectros, ajustou-se a potência de saída do laser de argônio a 90mW de potência, chegando na amostra aproximadamente 55mW. A coleta dos espectros foi feita com um tempo de exposição de 10 segundos e 5 acumulações, totalizando 50 segundos por espectro coletado.

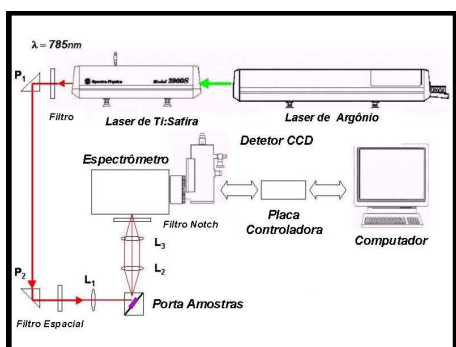


Figura 1 – Diagrama de Blocos do sistema Raman dispersivo no infravermelho próximo 785 nm.

FT-Raman no infravermelho 1064 nm

O espectrômetro utilizado foi o FT-Raman (BRUKER RFS/100), do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Como parâmetros para aquisição utilizou um laser de Nd:YAG focado, com um comprimento de onda em 1064nm para excitar a amostra. A potência do laser incidente na amostra foi ajustada em 200mW e 100 acumulações foram realizadas em 3 pontos da superfície de cada amostra de dentina.

Resultados

Para a análise dos resultados foi realizada a média aritmética dos três pontos coletados por espectro. Para a calibração dos espectros coletados pelo sistema no infravermelho próximo (785nm), utilizou-se um ajuste polinomial de ordem 3. Como tratamento dos espectros utilizou-se um filtro polinomial de grau 3, para melhorar a relação sinal-ruído.

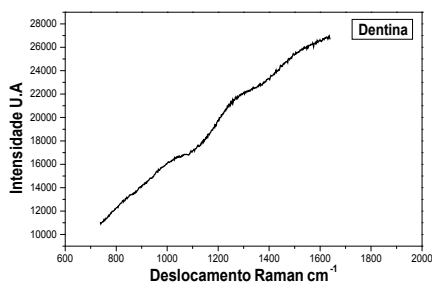


Figura 2 – Espectro Raman coletado pelo sistema Micro-Raman dispersivo no visível 514.5 nm

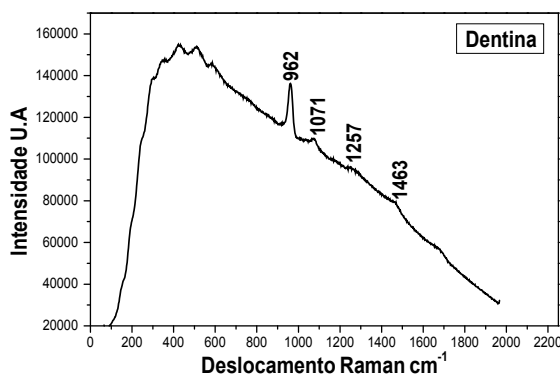


Figura 3 – Espectro Raman coletado pelo sistema Raman dispersivo no infravermelho próximo 785 nm

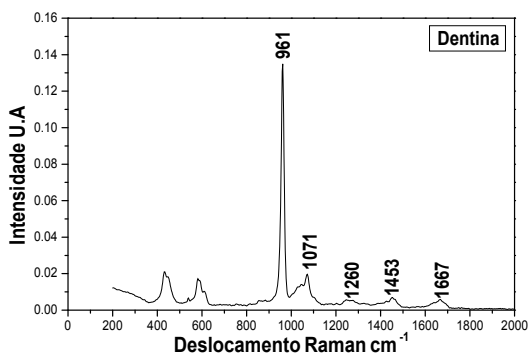


Figura 4 – Espectros Raman coletados pelo sistema FT-Raman no Infravermelho 1064 nm.

Discussões

Os espectros apresentaram comportamentos diferenciados, sendo que no espectro coletado pelo sistema Micro-Raman com excitação no visível (514.5 nm) não foi possível observar a presença de bandas relacionada aos materiais orgânicos (Figura 2) presentes na dentina, permanecendo evidente a interação laser-tecido biológico, onde se observou macroscopicamente uma total dispersão da luz laser quando focada nas amostras, ocorrendo um fenômeno de reflexão.

Os sistemas Raman dispersivo no infravermelho próximo (785 nm) e FT-Raman (1064nm) evidenciaram as bandas vibracionais dos substratos da dentina superficial (Figuras 3 e 4). Foram observadas as bandas da Hidroxiapatita, dos fosfatos e do colágeno, sendo que o pico da Hidroxiapatita encontra-se com deslocamento Raman em 961cm^{-1} , dos fosfatos em 1071cm^{-1} e do colágeno em 1260, 1453 e 1667cm^{-1} , quando analisadas pelo sistema FT-Raman em 1064nm. Já no Sistema Raman no Infravermelho Próximo em 785nm, houve

distorções nas medidas, devido a calibração dos espectros, onde identificou-se Hidroxiapatita em 962cm^{-1} , fosfatos em 1071cm^{-1} e colágeno em 1257 e 1463cm^{-1} .

As diferenças espectrais entre os sistemas Raman dispersivo (785nm) e FT-Raman (1064nm) estão relacionadas à radiação de fluorescência (*background*), como mencionada anteriormente, este fenômeno consiste em um dos problemas quando se estudam materiais biológicos utilizando a espectroscopia Raman.

Uma outra diferença observada entre os três sistemas Raman foi a detecção de modos vibracionais relacionados com matéria orgânica, com deslocamentos das ligações C-H em 2882, 2940 e 2978cm^{-1} [12]. Esta região do espectro foi somente identificada no sistema FT-Raman (1064nm) (Figura 5).

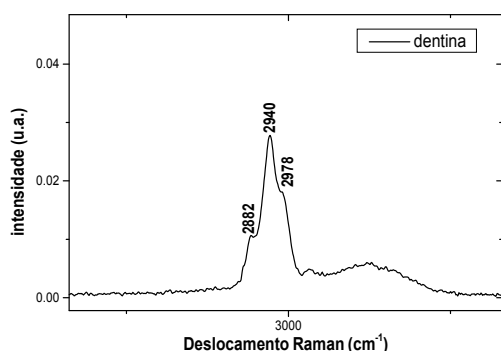


Figura 5- Espectro de modos vibracionais relacionados com a matéria orgânica, somente identificados pelo sistema FT-Raman no infravermelho.

Conclusão

A interação laser-tecido biológico está relacionada ao comprimento de onda de excitação, onde se evidencia a utilização de comprimentos de onda na região do infravermelho (1064nm) para não excitar a radiação de fluorescência associada aos níveis de energia das camadas eletrônicas das moléculas. O sistema de espectroscopia FT-Raman apresentou melhores resultados no estudo dos componentes biomoleculares da dentina, identificando com maior resolução a presença de bandas relacionadas ao componente fosfato e hidroxiapatita, abrangendo uma maior área do espectro com mais informações para o estudo da dentina humana.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da UniVap e ao Instituto Nacional de Espaciais (INPE) pelo suporte para a realização deste trabalho.

Referências

- [1] KATCHBURIAN, EDUARDO, ARANA, VICTOR. **Histologia e Embriologia Oral**. Editora Guanabara & Koogan, Rio de Janeiro, 1999. Cap.7, pág.183.
- [2] MJÖR, I.A. FEJERSKOV, O. **Embriologia e Histologia Oral Humana**. Editora Médica Panamericana, São Paulo, 1990. Cap.4, pág.90 e 91.
- [3] ODA, M.; MATOS, A.B.; LIBERTI, E.A. Morfologia da dentina tratada com substâncias dessensibilizantes: avaliação através da microscopia eletrônica de varredura. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.13, n.4, p.337-342, out./dez. 1999.
- [4] NISHINO, M.; YAMASHITA, S.; AOBA, T.; OKAZAKI, M.; MORIWAKI, Y. The laser-Raman spectroscopic studies on human enamel and precipitated carbonate-containing apatites. **J Dent Res**. 60(3):751-755, 1981.
- [5] DE MUL, F.F.M.; HOTTENHUIS, M.H.J.; BOUTER, P.; GREVE, J.; ARENDS, J.; TEN BOSCH, J.J.. Micro-Raman line broadening in synthetic carbonated hydroxyapatite. **J Dent Res**. 65:437-440, 1986.
- [6] NELSON, D.G.A.; WILLIAMSON, B.E. Low-temperature laser Raman spectroscopy of synthetic carbonated apatites and dental enamel. **Aust J Chem**. 35: 715-727, 1982.
- [7] SAUER, G.R.; ZUNIC, W.B.; DURIG, J.R.; WUTHIER, R.E. Fourier Transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. **Calcif Tissue Int**. 54:414-420, 1994.
- [8] REY, C.; SHIMIZU, M.; COLLINS, B.; GLIMCHER, M.J. Resolution enhanced Fourier Transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: I. Investigation of the n_4 PO_4^{3-} domain. **Calcif. Tissue Int**. 46:384-394, 1990.
- [9] PUECH, P.F.; DHAMELIN COURT, M.; TAIEB, M.; SERRATRICE, C. Laser Raman microanalysis of fossil tooth enamel. **J. Hum. Evol.** v15:13-19, 1986.
- [10] SOARES, L. E. S.; MARTIN, A. A.; JR. BRUGNERA, A.; ARISAWA, E. A. Analytical evaluation of human dentin irradiated with Er:YAG laser. **Lasers in Medical Science**. Abstract n. 125 pag. S29, 2003.
- [11] ARRAIS, C. A. G.; GIANNINI, M.; Morphology and thickness of the diffusion of the resin through demineralized or unconditioned dental matrix. **Pesqui. Odontol. Bras**. 16 (2):115-120, 2002.
- [12] WENTRUP-BYRNE, E.; ARMSTRONG, C. A.; ARMSTRONG, R. S.; COLLINS, B. M. Fourier Transform Raman Microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, 151-158, 1997.