

ESPECTROSCOPIA RAMAN DE DENTES BOVINOS EM PÓ, PARCIALMENTE DESNATURADOS

Sabrina de Moura Rovetta^{1,2}, Ana Maria do E. Santo¹, Airton A. Martin¹, Walter Miyakawa²

¹Universidade do Vale do Paraíba, Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, S. J. dos Campos, Brasil – e-mail: sabrinam_sjc@yahoo.com.br

²Instituto de Estudos Avançados, Divisão de Fotônica, S. J. dos Campos, Brasil – e-mail: wmi@ieav.cta.br

Resumo- A espectroscopia Raman é uma técnica não destrutiva de análise qualitativa de compostos orgânicos e inorgânicos. No presente trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar a influência da granulometria em amostras de dentina e esmalte bovinos em pó, parcialmente desnaturados, com o objetivo de facilitar a visualização das bandas do modo vibracional ν_1 do carbonato (CO_3^{2-}), centrado em 1070 cm^{-1} e do modo ν_3 do fosfato de cálcio (PO_4^{3-}), centrado em 1044 cm^{-1} . Os resultados foram comparados com os espectros de amostras naturais (não desnaturadas). Verificou-se que os espectros apresentaram diferenças em função do tamanho das partículas e de forma mais pronunciada nas amostras de dentina do que nas de esmalte. Concluiu-se que o tamanho do grão, associado a uma desnaturação parcial favorece a visualização de bandas em espectros Raman.

Palavras-chave: esmalte, dentina, desnaturação, espectroscopia Raman

Área do Conhecimento: Ciências da saúde

Introdução

O dente é um órgão composto de uma matriz orgânica, formada basicamente de proteínas, lipídios e fibras de colágeno, e de uma matriz inorgânica, constituída majoritariamente por hidroxiapatita, uma forma complexa de fosfato de cálcio (apatita) com hidroxila e cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (TORNECK, 1994). Ambas as matrizes estão presentes nos tecidos da dentina e do esmalte. A principal diferença entre esses tecidos está na proporção em que a matriz orgânica está presente em cada um deles, sendo bem maior na dentina do que no esmalte.

Esses tecidos podem ser caracterizados por espectroscopia Raman, que é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada por ser rápida, não destrutiva, e de custo relativamente baixo (SMITH et al., 2005, FERRARO, 2003).

Uma peculiaridade, proveniente da natureza biológica desse material, é a proximidade entre o modo vibracional ν_1 do carbonato (CO_3^{2-}), centrado em 1070 cm^{-1} [ref], e o modo vibracional ν_3 do fosfato de cálcio (PO_4^{3-}), centrado em 1044 cm^{-1} [ref]. Essa proximidade resulta numa sobreposição de bandas no espectro Raman, o que dificulta sua identificação. Em nosso trabalho anterior, verificou-se que, nos espectros de amostras na forma de pó, a identificação de banda é mais fácil do que nos espectros de amostras em bloco. O objetivo do presente trabalho foi, então, avaliar se a influência da granulometria na facilidade de identificação de bandas dos espectros Raman de

esmalte e dentina bovinos parcialmente desnaturados.

Metodologia

As amostras foram preparadas a partir de dentes bovinos recentemente extraídos e conservados em solução fisiológica de NaCl a 0,9%. Cortes vestibulo-lingual foram feitos na direção sagital do dente, resultando em lâminas de aproximadamente 0,7 mm de espessura, utilizando uma máquina de corte de baixa rotação (ISOMET 1000, Buehler Ltd., IL, USA) com disco adiamantado de 10 cm de diâmetro e 0,3 mm de espessura (ISOMET 11-1180, Buehler Ltd., IL, USA). Com o auxílio de um alicate de corte, separou-se o esmalte da dentina. Os tecidos foram então moídos, separadamente, com o auxílio de um pistilo em almofariz (Figura 1 (a)).

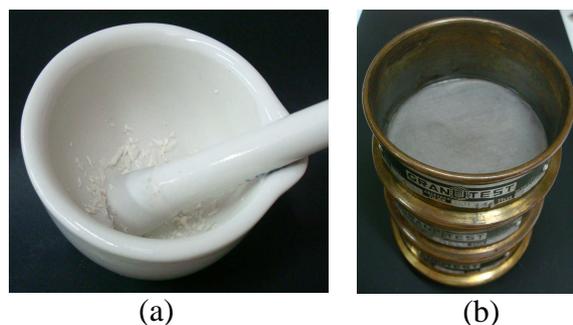


Figura 1:(a) processo de moagem e (b) coluna de peneiras.

Os pós obtidos passaram por uma coluna de peneiras com diferentes malhas (Figura 1 (b)), para separar as amostras em função do tamanho dos grãos. Foram, assim, montados quatro grupos de esmalte e quatro grupos de dentina, classificados da seguinte forma: grupo 1: grãos entre 177 μm e 105 μm ; grupo 2: grãos entre 105 μm e 74 μm ; grupo 3: entre 74 μm e 62 μm , e grupo 4: entre 62 μm e 44 μm .

Os pós de cada grupo foram analisados em um espectrômetro FT-Raman (RFS 100, Bruker), do LEVB-UNIVAP, com os seguintes parâmetros: 100 mW de potência do laser de excitação (Nd:YAG, 1,06 μm), 100 varreduras por ponto, resolução espectral de 4 cm^{-1} , em cinco pontos por amostra, na região entre 100 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . Os espectros médios de cada grupo foram comparados com os espectros de dentina e esmalte em bloco do trabalho anterior (ROVETTA, 2008).

Para a desnaturação (remoção da parte orgânica) das amostras, foi preparada uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 6,0%, utilizando o método de titulação volumétrica.

O processo de desnaturação foi feito colocando-se dentina e esmalte, em pó, de cada grupo, em tubos cônicos (Figura 2 (a)), aos quais foram adicionados 100 μL da solução de hipoclorito de sódio a 6 %. As amostras ficaram em contato com a solução por 5,5 minutos. Durante este período, os tubos foram constantemente homogeneizados, para assegurar que todo o pó estava em contato com a solução, e evitar a formação de bifases (Figura 2 (b)).

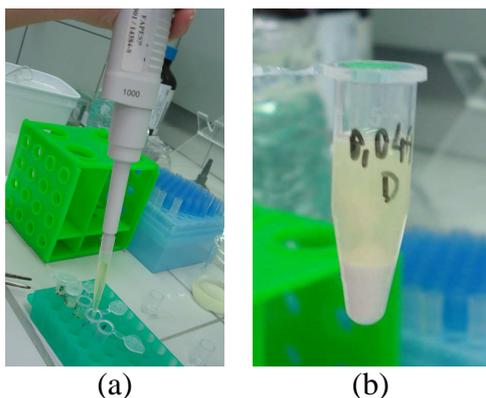


Figura 2: (a) adição da solução de hipoclorito de sódio e (b) solução em contato com o pó formando duas fases.

Decorridos os 5,5 minutos, as soluções foram versadas em um funil com papel filtro. O pó resultante foi, então, lavado com água destilada e mantido no interior de uma capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, durante 24 horas para a secagem.

As amostras desnaturadas dos grupos de dentina e de esmalte foram colocadas em porta-amostras de alumínio para a obtenção dos espectros Raman, com os mesmos parâmetros das amostras que não sofreram o tratamento de desnaturação.

Após a obtenção dos espectros, deu-se início à fase de pré-processamento dos dados. Inicialmente, para cada grupo, foi feita a média aritmética dos cinco espectros de cada amostra. Em seguida, as linhas de bases foram corrigidas pelo método de *Rubberband* (VICKREY, 1983) e a curva, suavizada com o filtro de Savitsky-Golay (FERRARO, 2003) (ajuste polinomial de quarta ordem) com uma janela de dez pontos. Por último, os espectros foram normalizados vetorialmente.

Resultados

A Figura 3 mostra o espectro Raman do esmalte natural. Observa-se que, de um modo geral, os espectros relativos às amostras dos grupos 1 e 2 apresentaram menos ruído que os dos grupos 3 e 4. Na região das bandas do modo ν_3 do fosfato e do carbonato, nota-se que todos os grupos apresentaram boa visualização.

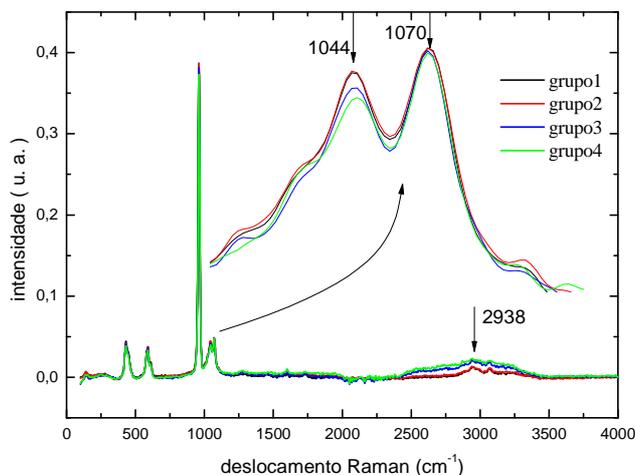


Figura 3: Espectro Raman de esmalte natural.

Para o esmalte desnaturado (Figura 4), os espectros apresentaram menos ruído, quando comparados aos de esmalte natural. Visualmente, as bandas de fosfato e carbonato também estão igualmente bem delineadas para todos os grupos. Observa-se também que o pico de 2938 cm^{-1} , referente à matriz orgânica de colágeno, desaparece, quase que por completo, comparado ao espectro do esmalte natural, o que comprova a ação da solução desnaturante.

Estes resultados sugerem que os tamanhos de grão avaliados são equivalentes para a identificação das bandas do modo ν_3 do fosfato e

do carbonato do esmalte, tanto o desnaturado quanto o natural.

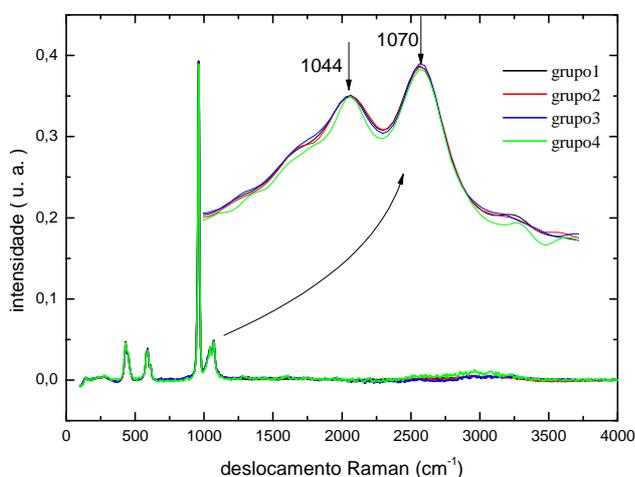


Figura 4: Espectro Raman de esmalte desnaturado.

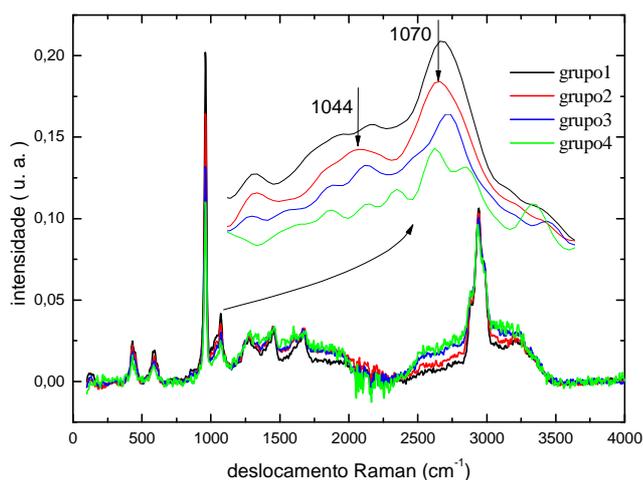


Figura 5: Espectro Raman de dentina natural.

Diferentemente do esmalte, as distinções entre grupos foi mais perceptível na dentina. Para a dentina natural (Figura 5), o espectro do grupo 1 apresentou a banda de CO_3^{2-} mais intensa e melhor definida. Já a banda do modo ν_3 do PO_4^{3-} mostrou-se muito pouco definida. Nos espectros dos grupos 2 e 3, tanto a banda do modo ν_3 do PO_4^{3-} quanto a do carbonato apareceram relativamente bem definidas, com ligeira vantagem para o grupo 2, em que ambas as bandas ficaram um pouco mais intensas. Inversamente, no espectro do grupo 4, essas duas bandas perderam, quase completamente, a definição visual.

No espectro das dentinas desnaturadas (Figura 6), comparado ao espectro de dentinas naturais, foi possível visualizar nitidamente a redução de efeitos de fluorescência no espectro como um todo

e a boa definição visual da banda de carbonato (1070 cm^{-1}) de todos os grupos. O espectro do grupo 3 apresentou melhor definição visual do pico do modo ν_3 de fosfato, maior intensidade da banda relativa ao modo ν_1 do carbonato e também foi o que mostrou a menor intensidade na banda de colágeno, sugerindo que a solução desnaturante foi mais efetiva para esse grupo.

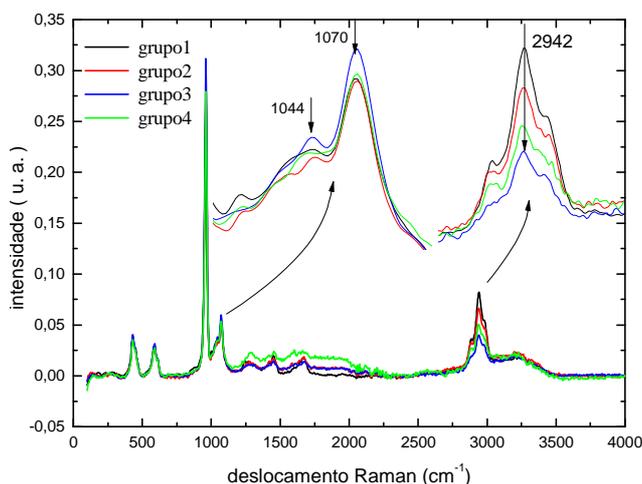


Figura 6: Espectro Raman de dentina desnaturada.

Discussão

Embora a matriz inorgânica do dente seja constituída majoritariamente por hidroxiapatita, sabe-se que outras formas de apatita podem estar presentes: fluoroapatitas, cloroapatitas, e apatitas carbonatadas (SAKAE, 2006; WENTRUP-BYRNE et al., 1997), além de outras fases de fosfato de cálcio: α - e β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfato de tetra-cálcio (LIN et al., 2001). Na dentina, por exemplo, essas fases podem ser formadas por tratamento térmico (LIN et al., 2001), que podem ser induzidas por irradiação com lasers (LIU et al., 2007, FOWLER et al., 1986) e, na odontologia, estas mudanças de fases visam aumentar a força de ligação de materiais restaurativos e promover maior resistência do dente à dissolução ácida (KLOCKE et al., 2007, FEURSTEIN et al., 2005, WHEELER et al., 2003). Assim, a importância da facilidade de identificação dos modos normais de vibração do PO_4^{3-} é inquestionável.

Na hidroxiapatita, o íon CO_3^{2-} pode substituir ou o íon OH^- ou o íon PO_4^{3-} (WENTRUP-BYRNE et al., 1997), provocando deformações na rede cristalina e resultando em fases menos estáveis e mais solúveis em ácido (LIU et al., 2007), o que torna o dente mais susceptível à cárie. Conseqüentemente, a caracterização da banda de carbonato também é relevante.

Já a utilização de soluções alcalinas de hipoclorito de sódio (NaOCl) em tecidos dentais duros também não é recente. Na prática clínica de tratamento de canais dentários, o hipoclorito é utilizado para a remoção de resíduos de tecidos orgânicos (GROSSMAN, 1981). À concentração de 6,5%, a solução de NaOCl também tem sido utilizada para a remoção de resíduos protéicos, para a avaliação dos tecidos dentais por diferentes técnicas de microscopia (MARSHALL et al., 2001, GRUVERMAN et al., 2007, HABELITZ et al., 2002).

Dado o baixo teor de matriz orgânica (da ordem de 2% em volume) no esmalte dental, os resultados semelhantes obtidos para o esmalte natural e o desnaturado já eram esperados e sugerem que a desnaturação não é imprescindível para a visualização das bandas dos modos vibracionais ν_3 do fosfato e ν_1 do carbonato.

Para a dentina, o aumento de intensidade observado na banda de CO_3^{2-} da amostra não desnaturada concorda com os resultados obtidos por Tsuda et al. (1996). Já a correlação do nível de ruído por fluorescência com o teor de matriz orgânica na dentina já havia sido observada por outros autores (PENEL et al., 1998, LIU et al., 2007 e TSUDA et al., 1996). E a combinação desses dois fatores auxilia a visualização da banda ν_1 de carbonato.

Com relação às granulometrias avaliadas neste trabalho, os resultados obtidos sugeriram a inexistência de um tamanho de grão preferencial para os espectros de esmalte, o que também pode ser justificado com base no baixo teor da matriz orgânica. Para a dentina natural, o fato dos grupos 2 e 3 (grãos nos intervalos 105-74 μm e 74-62 μm , respectivamente) apresentarem melhor visualização pode estar relacionado com o diâmetro do feixe do laser de excitação (100 μm) do espectrômetro Raman. Para a dentina desnaturada, a melhor visualização das bandas ν_3 do fosfato e ν_1 do carbonato pode ser atribuída ao fato dos grãos do grupo 3 (74-62 μm), além de terem sido melhor desnaturados, foram os que apresentaram menor variação de tamanho, comparado aos outros grupos avaliados.

Conclusão

Os espectros Raman de esmalte, tanto natural quanto desnaturado, apresentaram bandas relativas ao modo ν_3 do fosfato e ao carbonato semelhantemente bem definidas, permitindo concluir que os tamanhos de grão avaliados (44 μm – 177 μm) são equivalentes para a identificação dessas bandas. Além disso, o baixo teor de matriz orgânica no esmalte torna desnecessária a desnaturação dessas amostras.

Para a dentina, as diferenças foram visualmente mais significativas e, embora os grupos 2 e 3 tenham apresentado resultados próximos para a dentina natural, concluiu-se que o grupo 3 (62 μm) foi o que apresentou maior facilidade de identificação visual das bandas de interesse. Neste caso, a desnaturação parcial também contribuiu para a melhor visualização do espectro como um todo.

Referências

- ABNT-NBR-9425- Associação Brasileira de Normas Técnicas - Hipoclorito de Sódio-Determinação de Cloro Ativo.
- CUSCÓ, R., GUITIÁN, F.; DE AZA, S.; ARTÚS, L., Differentiation between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate by means of μ -Raman spectroscopy. **J. European Ceramic Society**, v. 18, p. 1301-1305, 1998.
- FERRARO, J. R., NAKAMOTO, K. et al. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2^a ed., Elsevier, U.S.A, 2003, p. 267-277.
- FEURSTEIN, O.; MAYER, I.; DEUTSCH, D. Physico-chemical changes of human enamel irradiated with ArF excimer laser. **Lasers in Surg. and Med.**, v. 37, p. 245-251, 2005.
- FOWLER, B.O.; KURODA, S., Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calc. Tissue Int.**, v. 38, p. 197-208, 1986.
- GROSSMAN, L., **Endodontic practice**, 10^a ed., Philadelphia: Lea&Febiger, 1981, p. 233-234.
- GRUVERMAN, A.; WU, D.; RODRIGUEZ, B.J.; KALININ, S. V.; HABELITZ, S., High-resolution imaging of proteins in human teeth by scanning probe microscopy, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 352, p. 142-146, 2007.
- HABELITZ, S.; BALOOCH, M.; MARSHALL, S. J.; BALOOCH, G.; MARSHALL Jr., G. W., In situ atomic force microscopy of demineralized human dentin collagen fibrils, **J. Struc. Biol.**, v. 138, p. 227-236, 2002.
- KLOCKE, A., MIHAILOVA, B., ZHANG, S., GASHAROVA, B., STOSCH, R., GÜTLER, B., KAHL-NIEKE, B., HENRIOT, P., RITSCHEL, BISMAYER, U., CO_2 laser-induced zonation in dental enamel: a Raman and IR microspectroscopic study. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.**, v. 81B, p. 499-507, 2007.
- LACERDA, K. A., Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia.

Metalurgia e Materiais, v.59, n.2, p. 217-223, abr./jun. 2006.

- LIN, C.; LEE, B.; LIN, F.; KOK, S.; LAN, W., Phase, compositional and morphological changes of human dentin after Nd:YAG laser treatment. **Journal of Endodontics**, v.27, n.6, p.389-393, 2001.

- LIU, Y., HSU, C.-Y. S., Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. **J Dent.**, v. 35, p. 226-230, 2007.

- MARSHALL Jr., G. W.; YÜCEL, N.; BALOOCH, M.; KINNEY, J. H.; HABELITZ, S.; MARSHALL, S. J., Sodium hypochlorite alterations of dentin and dentin collagen, **Surf. Sci.**, v. 491, p. 444-455, 2001.

- PENEL, G., LEROY, G., REY, C., BRES, E., MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites, **Calcif. Tissue Int.**, v. 63, p.475-481, 1998.

- ROVETTA, S. M., **Estudo comparativo de espectros Raman de dentes bovinos, obtidos a partir de amostras em blocos e em pó**, Relatório Final de Projeto de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UNIVAP, 2008.

- SAKAE, T. Variations in dental enamel crystallites and micro-structure. **J. Oral Biosci.** v. 48:2, p. 85-93, 2006.

- SMITH, E., DENT, G., **Modern Raman Spectroscopy- A practical Approach**. 1^a ed., John Wiley & Sons, Inc., England, 2005, p. 53-70.

- TORNECK, C. D., Dentin-pulp complex. In TEN CATE, A. R. (Ed.), **Oral Histology: Development, Structure, and Function**. 4^a ed., Mosby-Year Book, Inc., St. Louis. Missouri, 1994, p. 169-217.

- TORRES, S. R. M., **Caracterização comparativa do esmalte de dentes decíduos e permanentes por espectroscopia Raman**. 2008, 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

- TSUDA, H., RUBEN, J., ARENDS, J., Raman spectra of human dentin mineral. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 104, p. 123-131, 1996.

- WENTRUO-BYRNE, E., ARMSTRONG, C. A., ARMSTONG, R. S., COLLINS, B. M., Fourier transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. **J. Raman Spec.**, v. 18, p. 151-158, 1997.

- WHEELER, C.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.; WATANABE, L. Irradiation of dental enamel with Q-switched $\lambda=355$ -nm laser pulses: surface morphology, fluoride adsorption, and adhesion to

composite resin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, p. 310-317, 2003.

- YAMADA, M. K.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; WATARI, F., Three-dimensional topographic scanning electron microscope and Raman spectroscopic analyses of the irradiation effect on teeth by Nd:YAG, Er:YAG, and CO₂ lasers. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.**, v. 71B, p. 7-15, 2004.

- VICKREY, T. M., **Liquid chromatography detector**, in VICKREY, T. M. ed., *Chromatographic Science Series*, v. 23, Marcel Dekker Inc., New York, 1983, p. 383-385.