UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO

**Estudo preliminar de RPE em banda-K de esmalte dental e
hidroxiapatita sintética irradiados.**

Adevailton Bernardo dos Santos

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para concorrer ao
título de mestre, pelo curso de pós-graduação em
Física Aplicada a Medicina e Biologia.

São Paulo
2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO

**Estudo preliminar de RPE em banda-K de esmalte dental e
hidroxiapatita sintética irradiados.**

Adevailton Bernardo dos Santos

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para concorrer ao
título de mestre, pelo curso de pós-graduação em
Física Aplicada a Medicina e Biologia.

Orientador: Oswaldo Baffa Filho

São Paulo
2002

Adevailton Bernardo dos Santos.

Estudo preliminar de RPE em banda-K de esmalte dental e hidroxiapatita sintética irradiados / Adevailton Bernardo dos Santos. Ribeirão Preto, 2002.

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Física Aplicada a Biologia e Medicina.

Orientador: Oswaldo Baffa Filho.

1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) 2. Hidroxiapatita 3. Esmalte dental 4. Dosimetria de Radiação 5. Banda-K

Data da defesa: 29/08/2002.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho.

Julgamento:_____Assinatura_____.

Prof. Dr. Carlos Alberto Pelá.

Julgamento:_____Assinatura_____.

Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi.

Julgamento:_____Assinatura_____.

Prof. Dr. Thomaz Ghilardi Netto.

Julgamento:_____Assinatura_____.

Prof. Dr. Heitor Panzeri.

Julgamento:_____Assinatura_____.

Dedico este trabalho a toda a minha família e principalmente a memória de meu pai, que sempre estará presente comigo, em todos os meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho pelo apoio e ajuda fornecido para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi pela síntese das amostras de hidroxiapatitas do tipo B.

Aos professores do Departamento de Física e Matemática que sempre estiveram prontos a ajudar e através de suas aulas e conselhos, souberam dividir seus conhecimentos e experiências.

Aos colegas do grupo de pesquisa Ressomat que me acompanharam durante a realização deste trabalho, principalmente Ângela Kinoshita, que me ajudou com conselhos e dividindo sua experiência.

Aos colegas de mestrado, que juntos compartilhamos não somente as aulas, mas também as dificuldades, expectativas e às vezes até decepções, principalmente Shirlei e Marcelo, que mais que colegas souberam ser amigos durante esta jornada.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Física e Matemática, que sempre se mostraram companheiros de trabalho, auxiliando-me em tudo que necessitei.

Ao Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, principalmente Gustavo, que me ajudou com presteza durante a irradiação das amostras.

A CAPES pelo suporte financeiro deste projeto e a FAPESP pelo apoio na aquisição do espectrômetro em banda-K.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, me auxiliaram na execução deste projeto.

RESUMO

ADEVAILTON, B. S. **Estudo Preliminar de RPE em Banda K de Esmalte Dental e Hidroxiapatita Sintética Irradiados**. 2002. 70p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A hidroxiapatita e o esmalte dental são, na atualidade, alguns dos materiais mais pesquisados pela técnica de espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica – RPE. O esmalte dental, que possui cerca de 97% de sua massa constituída por cristais de hidroxiapatita, se apresenta como o tecido humano preferencial para dosimetria de radiação com o uso desta técnica, principalmente no caso de exposições acidentais da população em geral. A análise de hidroxiapatitas sintéticas tem por finalidade auxiliar o entendimento do espectro do esmalte dental bem como desenvolver um dosímetro de radiação com boa eficiência e eficácia. O espectrômetro em banda-K utiliza uma frequência intermediária aos espectrômetros em banda-X e em banda-Q, possuindo uma melhor resolução que banda-X sem as dificuldades, devido à alta sensibilidade, do banda-Q. O presente trabalho tem como objetivo analisar espectros em banda-K de um bloco de esmalte irradiado e de hidroxiapatitas sintéticas, comparando com espectros de banda-Q e banda-X presentes na literatura, e ainda verificar a possibilidade de se fazer dosimetria de radiação com o uso deste aparelho.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Esmalte Dental, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Dosimetria, Banda-K.

ABSTRACT

ADEVAILTON, B. S. **Preliminary Study of EPR in K-Band of Dental Enamel and Hydroxyapatite Synthetic Irradiated.** 2002. 70p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Hydroxyapatite and tooth enamel are, nowadays, some of materials mostly investigated by the spectroscopic technique of Electron Paramagnetic Resonance – EPR. Tooth enamel, that have about of 97% of its mass constituted by hydroxyapatite crystals, appears itself as the preferential human tissue for radiation dosimetry using EPR, mainly in case of accidental expositions by ordinary personnel. The analyses of synthetic hydroxyapatites have as the main goal to help the understanding of tooth enamel's spectrum seeking the developing of a radiation dosimeter with good efficiency and accuracy. The K-band EPR spectrometer uses an intermediate frequency between the spectrometers in X-band and Q-band, possessing a better resolution than the X-band without presenting the Q-band's difficulties. In this preliminary work the EPR spectra of a small block tooth enamel and synthetic hydroxyapatites irradiated were analyzed in K-band, comparing the results with X- and Q-band with published results, the possibility of performing radiation dosimetry at K-band was verified.

Key-words: Hydroxyapatite, Tooth Enamel, Electron Paramagnetic Resonance (EPR), Dosimetry, K-Band.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	5
2.1. Ressonância Paramagnética do spin eletrônico (RPE).	5
2.1.1. Fator g.	9
2.1.1. Absorção de energia e relaxação spin-rede.	10
2.1.3. Interação nuclear hiperfina.	13
2.1.4. Interação hiperfina com vários núcleos.	15
2.1.5. Parte experimental da ressonância paramagnética eletrônica.	17
2.2. Hidroxiapatita (HAp).	23
2.3. Esmalte dental.....	26
2.4. RPE de bioapatitas e do esmalte dental.....	30
2.5. Dosimetria por RPE.	32
3. Material e métodos.....	35
3.1. Síntese da Hidroxiapatita do tipo B.	35
3.2. Preparação da amostra de esmalte dental.	37
3.3. Espectrômetro banda-K.....	38
3.4. Irradiação.....	39
3.5. Seleção das amostras de HAp do tipo B.	40
3.6. Seleção dos parâmetros de operação do espectrômetro de RPE.	41
3.6.1. Potência de microondas.....	42
3.6.2. Amplitude de modulação do campo magnético.	42
3.6.3. Posicionamento da amostra e reprodutibilidade do sinal.	44
4. Resultados e discussões.....	47
4.1. Análise do espectro do esmalte dental em banda-K.	47
4.2. Análise dosimétrica da HAp do tipo B.	52
5. Conclusões.....	58
6. Bibliografia.	60

1. Introdução

A partir dos meados do século XX, as radiações ionizantes passaram a ser utilizadas, em uma escala cada vez maior, em aplicações próximas ao cotidiano das populações. Dentre as utilidades das radiações ionizantes, as aplicações médicas em diagnóstico e tratamento de patologias cancerígenas são as mais importantes e fazem parte da rotina hospitalar.

Apesar da importância, as radiações ionizantes devem ser usadas com cuidado, equilíbrio e responsabilidade. Os efeitos sobre o organismo humano podem deixar seqüelas, sendo que altas doses podem provocar lesões irreversíveis e até a morte. Para o melhor uso das radiações ionizantes, se fez importante desenvolver métodos que possibilitem sua medida quantitativa, sendo que com este intuito surgiram os dosímetros.

Os dosímetros de radiações ionizantes são constituídos de substâncias que possuem uma propriedade que é alterada pela radiação: formação de íons como no caso das câmaras de ionização; reações químicas como no caso do dosímetro de Fricke; mudanças na condutividade como no caso dos diodos semicondutores; defeitos estáveis, em condições normais, na estrutura eletrônica do material como no caso dos dosímetros termoluminescentes (TL); quantidade de radicais livres nos dosímetros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE); dentre outros¹.

Os dosímetros TL utilizam a luz emitida por cristais, quando aquecidos, como indicador da dose. Ao absorver um fóton, com uma energia apropriada, um elétron, de determinados cristais, pode ser excitado para um nível de energia maior, deixando em seu nível original um vazio, chamado de buraco. A alta temperatura faz com que este elétron retorne ao nível original. Durante o retorno, ocorre a emissão da energia que fora absorvida na excitação, na forma de luz. A intensidade da luz é tanto maior

quanto maior for a quantidade de recombinações elétron-buraco, que por sua vez é indicadora da dose de radiação¹.

Os dosímetros de RPE utilizam a absorção de microondas pelos centros paramagnéticos, em condições de ressonância, como indicador da dose. A quantidade de centros paramagnéticos em um dosímetro é proporcional a dose de radiação ionizante absorvida, que por sua vez é proporcional à absorção de microondas em condições de ressonância^{1,2}.

Uma das principais vantagens do método de dosimetria por RPE sobre a dosimetria por TL é a não destruição da propriedade física utilizada na dosimetria: durante a dosimetria por TL os elétrons se recombina com os buracos, tornando a medida única, impossível de ser reconstituída; sendo que na dosimetria por RPE os centros paramagnéticos não são destruídos, podendo haver não somente a reprodução da medida, como também utilizar o mesmo dosímetro para fazer dosimetria de doses aditivas, caso útil para tratamentos radioterápicos, onde a dose total é, em muitos casos, fracionada em várias seções de radioterapia.

Dentre os materiais utilizados para dosimetria por RPE, a alanina³ tem grande destaque por possuir grande similaridade com sistemas biológicos. Outras vantagens correspondem à alta estabilidade dos radicais gerados, e a grande sensibilidade à dose. Alguns trabalhos utilizando a alanina como dosímetro de radiação em práticas médicas demonstram a sua aplicabilidade^{4,5}.

Na determinação da dose absorvida por indivíduos do público geral, principalmente no caso de acidentes envolvendo radiações ionizantes, a dosimetria por RPE se destaca, e os materiais mais usados são os ossos e dentes. O motivo é que estes materiais possuem em sua constituição bioapatitas, ou seja, apatitas que são produzidas por organismos biológicos (atualmente existem bioapatitas sintéticas).

As bioapatitas, principal constituinte dos tecidos calcificados dos seres humanos (ossos e dentes), possuem impurezas em sua rede cristalina, principalmente carbonatos, que quando expostos à radiação ionizante geram centros paramagnéticos. Alguns radicais carbonatos formados pela radiação ionizante possuem uma estabilidade muito grande a temperatura ambiente (até 10⁷ anos) o que permite a sua aplicação em dosimetria e datação geológica^{2,6}. Esta técnica foi usada com êxito por Ikeya et al.⁷ para determinar a dose de radiação em sobreviventes da bomba atômica

(Japão – Segunda Guerra Mundial) e por Ishii et al.⁸ para determinar a dose em pessoas residentes próximos ao reator de Chernobyl.

A hidroxiapatita (HAp) é um cristal hexagonal cuja composição básica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com parâmetros de rede $a=b=9,432\text{\AA}$ e $c=6,881\text{\AA}$ ⁹. A estrutura apresenta um canal central onde estão localizadas as hidroxilas, em torno do qual se distribuem os átomos de cálcio e os fosfatos. Os carbonatos (impurezas no cristal) presentes na estrutura podem estar localizados em dois sítios diferentes: sítio A, substituindo a hidroxila e sítio B substituindo o fosfato.

Os primeiros trabalhos com o espectro de RPE do esmalte dental irradiado tinham como finalidade analisar a disposição dos cristais de HAp na estrutura dental, incluindo a diferenciação do espectro em relação à susceptibilidade as cáries^{10,11,12}. Como resultado destes estudos foi observada a complexidade do espectro, sendo que para sua utilização em dosimetria tornou-se necessário fazer sua interpretação.

Os estudos que se seguiram passaram a utilizar bioapatitas sintéticas na tentativa de elucidar o espectro do esmalte dental, sendo que concomitantemente se inicia o uso das mesmas com finalidade de dosimetria de radiação. O sinal obtido no esmalte dental, que inicialmente era atribuído principalmente ao radical^{11,12} CO_3^{3-} , passa a ser atribuído a diversos radicais CO^- , CO_2^- , CO_3^{3-} , CO_3^- , e O^- , inclusive identificando sinais que possuem origem em carbonatos localizados na superfície do cristal, com a possibilidade de terem sido incorporados à estrutura por absorção de moléculas de CO_2 do ar atmosférico^{13,14,15,16}.

Para os trabalhos de dosimetria, os espectrômetros de RPE mais usados são os que operam em banda-X, com uma frequência de microondas em torno de 9 GHz, e os que operam em banda-Q, com frequência em torno de 35 GHz.

O espectrômetro que opera em banda-X possui fácil operação, sendo que a facilidade da reprodutibilidade das medidas faz deste aparelho o principal instrumento de dosimetria por RPE. No entanto a frequência baixa produz pouca resolução no espectro obtido, bem como a necessidade de uma grande quantidade de amostra para se obter um resultado significativo (dependendo da dose pode ser de mais de 100mg). Em uma dosimetria nem sempre é possível se ter grandes quantidades de amostras, principalmente no caso de tecidos vivos sadios.

O espectrômetro que opera em banda-Q, devido à alta sensibilidade, dificulta a reprodutibilidade das medidas, no entanto a quantidade de amostra que se utiliza é muito pequena. O seu uso em dosimetria é restrito e raro.

Neste trabalho, o estudo da dosimetria será feito em um espectrômetro que opera em banda-K, cerca de 24 GHz. Ao utilizar uma frequência intermediária ao de banda-X e de banda-Q, o espectrômetro em banda-K constitui uma tentativa inédita de se fazer dosimetria com boa resolução e com pouca quantidade de amostra (o número de spins detectado é inversamente proporcional ao quadrado da frequência de microondas), sem possuir dificuldades de operação e reprodutibilidade. Os materiais que serão analisados no espectrômetro em banda-K são alguns tipos de apatitas do tipo B e o esmalte dental humano.

O principal objetivo deste trabalho é fazer medidas sistemáticas neste aparelho com o intuito de mostrar a sua aplicabilidade em dosimetria e datação. O uso do espectrômetro em banda-K, uma vez normalizado, pode ser de grande valor em dosimetria de radiações.

No capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica: conceitos que, quando aplicados, possibilitam a espectroscopia de RPE; o funcionamento dos espectrômetros de RPE; a descrição da HAp e do esmalte dental.

No capítulo 3 serão descritos os materiais e métodos: as confecções das amostras, o espectrômetro de RPE em banda-K, a irradiação das amostras e a otimização dos parâmetros do aparelho de RPE.

No capítulo 4 será feita a apresentação e a discussão dos resultados obtidos: a análise do espectro do esmalte dental e a avaliação das propriedades dosimétricas das hidroxiapatitas utilizadas, bem como o comportamento do espectrômetro operando em banda-K com finalidades de dosimetria.

No capítulo 5 será feita a conclusão do trabalho.

2. Revisão da literatura.

2.1. Ressonância Paramagnética do spin eletrônico (RPE).

A técnica de ressonância paramagnética do spin eletrônico (RPE) é uma das mais importantes para análise da estrutura da matéria. Suas aplicações estão relacionadas com dosimetria de radiação; datação de fósseis (dentes, ossos e conchas), rochas e materiais arqueológicos (principalmente calcita); e também microscopia².

O princípio de aplicação da técnica é baseado na análise do espectro de absorção de radiação (microondas) pelos momentos de dipolo magnético do spin do elétron, o qual é obtido medindo a atenuação da radiação em função do comprimento de onda. A absorção de energia ocorre quando o elétron transiciona entre os níveis energéticos de seus momentos de dipolos magnéticos, sendo que a degenerescência entre os níveis energéticos é produzida por um campo magnético externo agindo sobre a amostra. A energia de um fóton ($h\nu$) da radiação deve ser igual à diferença de energia entre dois níveis energéticos dos momentos de dipolos magnéticos.

O dipolo magnético do spin do elétron é gerado devido à rotação do elétron sobre o seu próprio eixo. A direção deste dipolo é paralela ao eixo de rotação (figura 1).

Figura 1. Desenho indicando a rotação de uma partícula eletrizada em torno de seu próprio eixo e o dipolo magnético gerado devido a esta rotação.

As moléculas da amostra a ser analisada devem possuir elétrons desemparelhados (normalmente presentes em radicais iônicos) para que o spin produza um dipolo magnético não nulo. Quando há elétrons emparelhados, estes rotacionam em sentidos opostos e o dipolo magnético resultante é nulo.

Ao aplicarmos um campo magnético $\vec{H}$ na amostra com elétrons desemparelhados, criamos um vetor magnetização devido à direção preferencial do alinhamento dos dipolos magnéticos na direção de $\vec{H}$, sendo que estes anteriormente possuíam alinhamento aleatório (figura 2).

Figura 2. Desenho indicando a direção dos dipolos magnéticos: na esquerda temos direções aleatórias enquanto que na direita temos os dipolos alinhados devido ao campo magnético externo.

A energia W associada a cada momento de dipolo magnético $\vec{\mu}$ é dada pelo produto escalar entre o campo magnético $\vec{H}$ e o momento do dipolo:

$$W = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} = -\mu \cdot H \cdot \cos \theta$$

Nesta equação o ângulo θ indica o ângulo entre o vetor dipolo magnético e o vetor campo magnético. No caso dos dipolos magnéticos estarem na mesma direção do campo magnético teremos o ângulo θ igual a 0° ou 180° , e a energia W fica reduzida a dois possíveis valores:

$$W = -\mu \cdot H \cdot \cos 0^\circ = -\mu \cdot H$$

$$W = -\mu \cdot H \cdot \cos 180^\circ = \mu \cdot H$$

O momento magnético possui uma relação com o momento angular que é dado pela expressão:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{p} = (-e/2mc) \cdot \vec{p}$$

Onde γ é chamada de razão de giromagnética e vale $8,79409 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}\text{T}^{-1}$.

O momento angular total, $\vec{p}$, é expresso pela soma do momento angular orbital e momento angular devido ao spin do elétron, no entanto, na maioria dos casos o momento angular orbital contribui muito pouco para o momento angular total. Considerando que o momento angular total seja apenas o momento angular devido ao spin do elétron (sistema com $S=1/2$), os seus valores para projeções em uma dada direção são:

$$p = m_s \cdot \hbar \quad \text{e} \quad m_s = \pm 1/2$$

Ao associarmos as equações acima obtemos que em uma dada direção o módulo do momento de dipolo magnético vale:

$$\mu = m_s \cdot (-e\hbar/2mc)$$

O termo $e\hbar/2mc$ é chamado de magneton de Bohr e será representado por β :

$$\beta = e\hbar/2mc = 9,27401 \times 10^{-24} \text{ J/T}$$

Ainda é associado um fator na expressão, chamado de fator g . Este fator é requerido para os casos diferentes daqueles que envolvem momento angular puro. Com isto, o momento de dipolo magnético do spin do elétron $\vec{\mu}$ e a sua energia associada, W , podem ser calculados por:

$$\mu = -g \cdot \beta \cdot m_s$$

$$W = g \cdot \beta \cdot m_s \cdot H$$

Os níveis de energia para os possíveis valores de $m_s = \pm 1/2$, são chamados de energia de Zeeman e valem:

$$W = \pm g \cdot \beta \cdot H \cdot 1/2$$

No caso de um elétron fazer a transição entre os dois níveis energéticos de Zeeman (figura 3), a diferença de energia entre estes dois níveis deve ser igual à quantidade de energia fornecida por meio de radiação eletromagnética ($h \cdot \nu$), ou seja:

$$h \cdot \nu = \Delta W = g \cdot \beta \cdot m_s$$

Esta última equação resume as condições para que ocorra a ressonância do spin eletrônico^{17,18,19}.

Figura 3. Desenho mostrando a atenuação da radiação (microondas) devido à absorção de energia (Energia do fóton= $h \cdot \nu$). A energia do fóton é utilizada pelo elétron na transição entre os dois níveis energéticos de Zeeman (θ igual a 0° para 180°) conforme mostrado na área destacada em azul. O mecanismo de relaxação spin-rede faz com que a energia absorvida seja, em seguida, liberada para a rede, devolvendo o sistema a sua condição de equilíbrio.

2.1.1. Fator g.

O fator **g** é caraterístico para cada tipo de composto (no caso de um elétron livre **g=2,00232**) e pode ser obtido pela equação:

$$g = h \cdot \nu / \beta \cdot H = 714,4775067 \cdot \nu(\text{GHz}) / H(\text{gauss})$$

Este fator é anisotrópico para cristais e para substâncias que possuem uma direção preferencial de orientação. Há alguns compostos que se tornam isotrópicos por fatores físicos não moleculares, como por exemplo, substâncias diluídas em líquidos de baixa viscosidade ou pó de cristais triturados. Nestes casos a isotropia é obtida devido à orientação randômica, seja das moléculas no líquido ou das partículas de pó do cristal.

Para descrever propriedades de ressonância magnética em sistemas anisotrópicos, atribuímos que o fator **g** é dependente do ângulo entre o campo magnético e o eixo da amostra ou molécula. Quando o campo magnético tiver a direção do eixo x da molécula, ele será denominado de $\vec{H}_x$, e o fator **g** será:

$$g_{xx} = h \cdot \nu / \beta \cdot H_x$$

O mesmo ocorre para os eixos y e z onde teremos:

$$g_{yy} = h \cdot \nu / \beta \cdot H_y \quad \text{e} \quad g_{zz} = h \cdot \nu / \beta \cdot H_z$$

Deste modo podemos expressar o fator **g** como um tensor de segunda ordem:

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix}$$

A energia total do sistema:

$$W = \beta \cdot m_s \cdot g \cdot H$$

$$W = \beta \begin{pmatrix} m_{s_x} & m_{s_y} & m_{s_z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \end{pmatrix}$$

Para um radical, com sinal isotrópico $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz} = g_{ef.}$, onde g_{ef} corresponde ao g efetivo.

Alguns sistemas possuem uma simetria axial onde $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$, ou seja, os eixos x e y são equivalentes e apenas o eixo z possui anisotropia. Nestes casos o valor de g_{zz} é chamado de $g_{||}$, enquanto que g_{xx} e g_{yy} são denominados de $g_{\perp}$. Sistemas sem nenhum tipo de isotopia, ou seja, $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$, são chamados de ortorrômnicos.

2.1.1. Absorção de energia e relaxação spin-rede.

A interação de uma radiação eletromagnética, fótons de energia $h \cdot \nu$, com um elétron desemparelhado, sobre o qual atua um campo magnético $\vec{H}$, faz com que este elétron sofra uma transição do nível inferior de energia ($-g \cdot \beta \cdot H \cdot 1/2$) para o nível superior ($+g \cdot \beta \cdot H \cdot 1/2$). Do mesmo modo pode ocorrer o contrário, ou seja, o mesmo elétron sofrer uma relaxação do nível superior para o nível inferior (figura 4), liberando energia para o meio que o cerca (rede).

Figura 4. Esquema mostrando as transições do elétron entre os dois possíveis níveis de energia, provocada devido à absorção de energia (nível inferior para o superior) ou pela relaxação da rede (nível inferior para o superior).

Na presença do campo magnético $\vec{H}$, existirá no sistema de spins, uma diferença de população (n_0) entre os dois níveis de energia, considerando o equilíbrio termodinâmico em uma temperatura T . A relação entre a quantidade de elétrons que estão no nível superior (N_+) e a quantidade de elétrons que estão no nível inferior (N_-) será obtida pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\left(\frac{-\Delta W}{kT}\right)} = e^{\left(\frac{-g\beta H}{kT}\right)}$$

Como existe uma diferença de população quando o sistema se apresenta em equilíbrio termodinâmico, podemos concluir que o sistema não pode ganhar energia indefinidamente, sendo que à medida que o sistema absorve a energia da radiação eletromagnética, o excesso deve ser liberado para rede. Este processo é chamado de mecanismo de relaxação spin-rede. Toda vez que o valor de N_+ supera o valor de equilíbrio, devido à absorção de energia, o mecanismo de relaxação restabelece o equilíbrio, permitindo assim, que ocorra a absorção da radiação de forma contínua e o mecanismo da ressonância seja observado. A principal característica do mecanismo de relaxação spin-rede é o tempo de relaxação que será denominado de T_1 .

Pode-se analisar o processo de relaxação com base nas probabilidades de que um elétron desemparelhado sofra a transição entre os níveis energéticos possíveis. Chamaremos de $P\uparrow$ a probabilidade por unidade de tempo de que o elétron experimente uma transição do nível inferior para o nível superior devido à absorção de radiação, e $P\downarrow$ a probabilidade contrária. A taxa de mudança para o nível superior (devido à absorção da radiação) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- P\uparrow - N_+ P\downarrow$$

Sendo $N = N_+ + N_-$ o número total de spins e, $n = N_+ - N_-$ a diferença de população entre os dois níveis, então:

$$N_+ = 1/2 (N + n) \text{ e } N_- = 1/2 (N - n)$$

Combinando as duas equações acima podemos escrever:

$$\frac{dn}{dt} = 2 \frac{dN_+}{dt} = N(P \uparrow - P \downarrow) - n(P \uparrow + P \downarrow)$$

Assumindo que $P \uparrow = P \downarrow = P$, podemos concluir:

$$\frac{dn}{dt} = -2nP$$

Onde a probabilidade P está relacionada com a intensidade da radiação eletromagnética.

Se considerarmos agora $W \uparrow$ como sendo a probabilidade por unidade de tempo para que a relaxação spin-rede produza uma transição do nível inferior para o superior e, $W \downarrow$ a probabilidade contrária, então, a taxa de mudança do nível superior (causada pela relaxação) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- W \uparrow - N_+ W \downarrow$$

Seguindo o mesmo raciocínio descrito anteriormente, como nas transições devido à absorção de radiação, chegamos no resultado:

$$\frac{dn}{dt} = 2 \frac{dN_+}{dt} = N(W \uparrow - W \downarrow) - n(W \uparrow + W \downarrow)$$

Substituindo na equação acima o valor $T_1 = 1 / (W \uparrow + W \downarrow)$ que representa o tempo característico de relaxação spin-rede e, $n_0 = N (W \uparrow - W \downarrow) / (W \uparrow + W \downarrow)$ que representa a diferença de população em equilíbrio termodinâmico, (observar que neste caso $W \uparrow \neq W \downarrow$, pois senão n_0 seria zero) a equação acima fica:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1}$$

Combinando as duas taxas de transição, a que ocorre devido à absorção de radiação com a que ocorre devido à relaxação spin-rede, podemos obter a taxa de transição total:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1} - 2nP$$

Como no caso estacionário $dn/dt = 0$, pode-se concluir:

$$n = n_0 / (1 + 2 P T_1)$$

Caso $2 P T_1 \ll 1$, então $n \cong n_0$ e a absorção de radiação não perturba em muito a diferença de população de seu valor quando em equilíbrio termodinâmico. No entanto, se $2 P \gg 1 / T_1$, a diferença de população tende a zero ($n \rightarrow 0$), pois o sistema de spins não pode liberar o excesso de energia absorvida para a rede de modo suficientemente rápido. Esta condição é conhecida como saturação das microondas. Como a probabilidade P depende da potência da radiação, a forma de evitar a saturação é utilizar os menores valores possíveis para a potência, porém lembrando que o aumento da potência aumenta a precisão da medida. Deve-se fazer testes para medir a potência para qual a amostra sofre o processo de saturação, pois deste modo obtém-se a melhor precisão sem atingir a saturação^{17,18,19}.

2.1.3. Interação nuclear hiperfina.

O fato do elétron desemparelhado em uma amostra sofrer a ação dos campos magnéticos que agem sobre ele, constitui a principal condição para que possamos analisar o efeito da ressonância magnética. A ação de um campo magnético externo sobre o elétron já foi analisada anteriormente, no entanto este mesmo elétron pode sentir também a ação do campo magnético gerado pelos núcleos vizinhos, sendo que este se adiciona ao campo magnético externo. Esta interação é chamada de interação

nuclear hiperfina e faz com que os níveis de energia do elétron (figura 5) sofram um desdobramento criando uma estrutura espectral chamada de estrutura hiperfina .

O spin nuclear é caracterizado pelo número quântico I , e como o elétron, a sua projeção em uma dada direção é quantizada e representada pelo número quântico m_I . Para um núcleo com spin I , m_I pode adquirir $2I+1$ valores possíveis.

O campo magnético efetivo, que age sobre o elétron, é constituído da soma entre o campo magnético externo e o campo magnético gerado pelo núcleo, sendo que este último pode assumir $2I+1$ valores. Deste modo, existirá $2I+1$ campos magnéticos diferentes agindo sobre os elétrons desemparelhados (um tipo de campo magnético por elétron), gerando então $2I+1$ linhas de igual intensidade no espectro de ressonância, conhecidas como linhas de desdobramento hiperfino. A separação entre as linhas é chamada de constante de desdobramento hiperfino, representada pela letra a , e corresponde a uma medida da intensidade da interação entre o elétron e o núcleo^{17,18}.

Figura 5. Esquema dos níveis de energia para um sistema com $S = I = 1/2$. As setas mostram as possíveis transições energéticas que o elétron pode sofrer, sendo que cada transição origina uma linha no espectro de ressonância magnética.

Figura 6. Espectro simulado de RPE para hidrogênio atômico com constante de desdobramento hiperfino de 506,8 G. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Por exemplo, no caso do átomo de hidrogênio, com um elétron desemparelhado ($S = 1/2$) e um núcleo de spin $I = 1/2$, o núcleo possui dois possíveis estados dados por $m_I = \pm 1/2$, dividindo cada nível energético em dois (figura 5). Neste caso a ressonância pode ser observada para dois valores de campo magnético externo e, o espectro é constituído de duas linhas de absorção produzidas pelas transições indicadas pelas setas da figura 5. O espectro é mostrado na figura 6, sendo a constante de desdobramento hiperfino¹⁸ $a = 506,8\text{G}$.

2.1.4. Interação hiperfina com vários núcleos.

Devido à extensão espacial da função de onda de um elétron desemparelhado, é freqüente observar interação hiperfina com mais de um núcleo. Desta forma, a interpretação da estrutura hiperfina permite conhecer o estado do elétron. Existem dois casos limites: a) quando o elétron desemparelhado está localizado principalmente num íon central rodeado de átomos pertencentes a moléculas vizinhas, predomina a interação com o núcleo central, sendo que as outras interações

possuem menor intensidade; b) quando o elétron desemparelhado interage igualmente com núcleos equivalentes (comum em radicais orgânicos).

Neste último caso cada núcleo equivalente multiplica por dois o número de linhas geradas anteriormente, gerando um número total de linhas simples igual a 2^n . No entanto, levando-se em conta que ocorre equivalência entre algumas destas linhas, o número total de linhas que aparece no espectro é menor e estas possuem intensidades diferentes.

Um exemplo é o radical metil (CH_3), onde o elétron desemparelhado apresenta interação com os três núcleos equivalentes de hidrogênio: haveria uma produção de 8 linhas simples, no entanto, o espectro aparece com quatro linhas (figura 7) na relação de intensidade 1:3:3:1. Duas linhas do espectro aparecem como sendo a superposição de 3 linhas simples equivalentes (intensidade 3 vezes maior). No caso geral de n núcleos equivalentes de spin $I = 1/2$ observam-se $n+1$ linhas, enquanto que as intensidades são proporcionais aos coeficientes do binômio de Newton^{17,18} (figura 8).

Figura 7. Espectro simulado de RPE do radical metil. Notar as quatro linhas na relação de intensidade 1:3:3:1 e constante de desdobramento hiperfino de 23 G. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Figura 8. Desdobramento teórico devido à interação hiperfina do próton. Notar que em um caso onde exista 5 prótons equivalentes, o espectro apresentará 6 linhas tendo relação de intensidades igual a 1:5:10:10:5:1 (coeficientes do binômio de Newton).

2.1.5. Parte experimental da ressonância paramagnética eletrônica.

Os equipamentos modernos de RPE operam com microondas de várias faixas de frequências, e a classificação do aparelho é feita de acordo com esta frequência:

- Banda-L - 1 a 2 GHz
- Banda-S - 2 a 4 GHz
- Banda-X - 8 a 10 GHz
- Banda-K - 24 GHz
- Banda-Q - 35 GHz
- Banda-W - 95 GHz

Destes aparelhos, o mais comum é o de banda X, sendo que a figura 9 esquematiza os seus constituintes.

Figura 9. Esquema mostrando um espectrômetro de RPE operando em banda-X utilizando uma detecção sensível a fase de 100KHz.

O equipamento é constituído de várias partes: a) fonte de campo magnético, b) fonte de microondas, c) guia de ondas e cavidade ressonante, d) sistema de detecção e registro do espectro^{18,19}.

A) Fonte do campo magnético.

O campo magnético é gerado por eletroímãs de um modo suficientemente homogêneo sobre o volume da amostra, com intensidades que podem variar de zero até milhares de gauss. Pequenas variações de até 10 μ T podem ocorrer na intensidade do campo, no entanto são variações aceitáveis para amostras biológicas visto que as linhas obtidas são inerentemente largas. A homogeneidade obtém-se com peças polares de desenho apropriado que podem ter um diâmetro de até 40 cm e uma

separação de 4 a 8 cm. A estabilização do campo magnético é conseguida usando um dispositivo sensível a campo magnético, tal como um cristal de efeito Hall. A voltagem de saída do cristal Hall é uma função linear do campo magnético e é usado em uma retroalimentação para estabilizar o campo e permitir sua variação em forma linear.

B) Fonte de microondas.

Existem vários tipos de fontes de microondas: magnetrons, klystrons, geradores de estado sólido tais como varactors, e osciladores de efeito Gunn. Os geradores mais usados para a técnica de RPE são o klystron e diodos Gunn.

O klystron gera microondas na faixa de frequências de 500 até 35.000 MHz, e alguns produzem potências de onda contínua de até 25 kW enquanto outros produzem potência pulsada de até 10 kW. Em equipamentos de ressonância magnética eletrônica, o klystron proporciona saída de onda contínua com potências menores de 1W.

O klystron é uma válvula formada por um cátodo aquecido por corrente contínua, um ânodo e um eletrodo refletor. O ânodo é uma cavidade adjacente a uma caixa cujas paredes frente ao cátodo e ao refletor são grelhas metálicas. A cavidade está formada pelo corpo da válvula de tal forma que o ânodo está ao potencial da terra. Lateralmente, o ânodo termina numa janela de material isolante que se acopla ao guia de microondas. Ao aplicar um potencial negativo no cátodo, os elétrons emitidos aceleram-se para o ânodo atravessando as grelhas em direção ao refletor. Como o potencial do refletor é também negativo, os elétrons são freados e repelidos, voltando ao ânodo. Para determinados potenciais do refletor, os elétrons emitidos pelo cátodo e os repelidos pelo refletor começam a oscilar em fase, e a densidade de elétrons muda periodicamente de forma sustentada. Estas oscilações são o que geram as microondas.

C) Guia de ondas e cavidade ressonante.

Para levar as microondas para a cavidade ressonante utiliza-se uma guia de ondas, a qual é um tubo oco, comprido e de seção transversal retangular com paredes internas metálicas e polidas. Suas dimensões estão determinadas pela frequência das

microondas (3 cm no caso de 9 GHz). As componentes da ponte de microondas são: o T mágico, o isolador, o medidor de comprimento de ondas (ou frequência) e o atenuador.

O T mágico é um dispositivo que serve para acoplar a energia das microondas para dentro e fora da cavidade ressonante. Atua dirigindo as microondas que saem do klystron para a cavidade ressonante, e as microondas que são refletidas pela cavidade para o detector. Em muitos espectrômetros, esta função é realizada por um circulador.

Normalmente o T mágico está conectado com o klystron através de um isolador e um atenuador. O isolador é um dispositivo de ferrita que faz circular as microondas num só sentido, impedindo desta forma que as ondas refletidas na ponte retornem ao klystron. O atenuador é uma peça de material dielétrico, de superfície condutora, que é introduzido no guia de ondas e absorve uma fração variável da potência gerada pelo klystron.

A cavidade ressonante é um dispositivo usado para concentrar a energia das microondas. Funciona de tal forma que ao colocar a amostra dentro da cavidade a mesma poderá absorver a maior quantidade de potência possível. A cavidade ressonante pode ser retangular ou cilíndrica, de transmissão ou de reflexão. Uma cavidade de transmissão tem um orifício de acoplamento em ambos de seus extremos para a guia de onda, enquanto uma cavidade de reflexão possui um orifício de acoplamento em apenas um de seus extremos, que recebe o nome de íris. A cavidade de reflexão é mais usada que a de transmissão devido à sua habilidade superior para discriminar contra o ruído produzido pelo klystron. Como dentro da cavidade produzem-se ondas estacionárias, ao colocar a amostra dentro dela, a posição da amostra deve coincidir com a de máximo campo magnético e de mínimo campo elétrico.

D) Sistema de detecção e registro do espectro.

Os espectrômetros de RPE usam um diodo semicondutor para detectar as microondas, atuando como retificador, transformando as microondas em corrente contínua. Quando o campo magnético externo atinge o valor em ressonância, a amostra começará a absorver energia das microondas, causando uma pequena

diminuição da energia concentrada dentro da cavidade ressonante e, por conseguinte, uma diminuição nas microondas refletidas. Desta forma, uma absorção ressonante aparecerá como uma mudança na corrente do detector.

A detecção DC desta mudança na corrente é acompanhada por ruído considerável. Não obstante, consegue-se que o sinal que carrega a informação apareça numa frequência só, enquanto que as outras frequências são filtradas, obtendo uma melhora significativa na relação sinal/ruído. Esta técnica de detecção é conhecida como detecção sensível à fase. Para realizar este tipo de detecção, coloca-se um par de bobinas de Helmholtz (controladas por um oscilador) em ambos os lados da cavidade ressonante. Desta forma, um campo magnético AC de amplitude pequena e de frequência ν_m é superposto ao campo DC. Quando o campo magnético na amostra está perto da ressonância, uma componente do sinal detectado estará modulado na frequência ν_m . Este sinal é amplificado num amplificador de banda estreita, cuja a saída serve como uma das entradas do detector sensível a fase. A outra entrada deste detector é uma porção do sinal que controla as bobinas de modulação. A saída filtrada do detector é proporcional tanto à diferença de amplitude como a diferença de fase dos dois sinais de entrada.

Figura 10. Efeito da modulação de 100 kHz do campo magnético sobre a corrente de saída do detector.

A saída do detector sensível à fase é retificada e enviada a um registrador que pode ser um osciloscópio, graficador ou microcomputador. Se a amplitude do campo de modulação mantém-se pequena comparada com a largura do sinal de RPE, o sinal registrado será próximo da primeira derivada (primeiro harmônico) do sinal de absorção. Este último se explica com ajuda da figura 10, onde se mostra que quando

o campo muda entre H_a e H_b , a corrente no detector muda entre i_a e i_b . Se a passagem é pequena, $i_a - i_b$ será proporcional a inclinação da curva de absorção.

E) Forma de linha e largura.

As formas de linhas dos sinais de RPE nem sempre são simétricas, no entanto, quando se encontra formas simétricas, elas podem ser caracterizadas por dois tipos principais: Gaussiana (figura 11) e Lorentziana (figura 12).

Figura 11. Gráfico mostrando a curva de absorção do tipo Gaussiana, bem como a forma de sua primeira e segunda derivada.

Figura 12. Gráfico mostrando a curva de absorção do tipo Lorentziana, bem como a forma de sua primeira e Segunda derivada.

Observando as figuras 11 e 12, nota-se que independentemente do tipo da curva, a amplitude do sinal da primeira derivada é definida pela distância $2Y'_{\max}$, e a amplitude do sinal da segunda derivada é definida como a distância $A+B$. A largura da linha já é melhor interpretada pelos parâmetros ΔH_{pp} (intervalo de pico a pico), que representa a distância entre os extremos da primeira derivada, e por Γ que indica a metade do comprimento da linha que cruza com a curva de absorção, na metade de sua altura máxima.

2.2. Hidroxiapatita (HAp).

A hidroxiapatita (HAp) é um composto a base de cálcio e fosfatos, cuja composição química é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, e corresponde ao principal constituinte dos tecidos ósseos e dentários. Doenças que atingem os ossos estão sempre ligadas a sua maior ou menor deposição e com a sua reabsorção pelo o organismo. Atualmente o uso da HAp na área médica é de grande importância, possuindo diversas utilidades onde podemos destacar: carreadora de drogas no tratamento de câncer ósseo^{20,21}, material de preenchimento em locais de reabsorção óssea (principalmente patogênicas) devido a sua biocompatibilidade²² e recobrimento das superfícies metálicas de implantes ósseos e dentários possibilitando melhor osteointegração²³.

Estas aplicações na área médica já demonstram a importância do estudo da HAp, mas suas aplicações são mais amplas: o composto é usado em absorção de metais pesados em áreas poluídas e a análise de espectros de radicais CO_2 ionizados, por meio de ressonância paramagnética de spin eletrônico (RPE), é usada em dosimetria de radiação^{2,6}.

No caso de análise por RPE, a grande estabilidade dos radicais criados pela radiação, faz da HAp um dos materiais mais estudados²⁴⁻²⁶, sendo que sua presença nos tecidos calcificados dos seres vivos permite a datação de fósseis^{27,28} e medidas quantitativas de doses absorvidas, seja em caso de acidentes envolvendo materiais radioativos ou em tratamentos radioterápicos²⁹⁻³¹. Os radicais carbonatos, que são gerados pela radiação, tem origem em grupos carbonatos que estão presentes na

estrutura cristalina da HAp na forma de impurezas, variando de 2 a 6%. A localização destes radicais na estrutura cristalina ocorre em dois sítios diferentes: substituindo a hidroxila (HAp do tipo A) ou substituindo o fosfato (HAp do tipo B). A datação pela técnica de RPE permite analisar fósseis com milhões de anos, e corresponde a um diferencial para a técnica de datação por carbono 14 (radioisótopo com meia vida de 5.730 anos), cujo uso é limitado em cerca de 50 mil anos.

Segundo trabalhos experimentais feitos por Kay M. I., Young R. A. and Posner A. S⁹, por meio de difração de raios-x, a HAp é relatada como um cristal hexagonal apresentando a relação c/a igual a 0,7296 (figura 13), enquanto que as constantes de rede valem $c = 6,881 \text{ \AA}$ e $a = b = 9,432 \text{ \AA}$. A origem do sistema de coordenadas da célula unitária é um ponto sobre o eixo das hidroxilas (eixo c) e sobre um dos planos formado pelos hexágonos de cálcio (figuras 14 e 15).

Figura 13. A figura mostra a forma de uma célula unitária hexagonal, onde os vetores a , b e c são os vetores primitivos.

Ao observarmos o cristal ao longo do eixo c , temos 6 íons de cálcio nos vértices de uma forma hexagonal, formando um plano perpendicular ao eixo c (figuras 14 e 15), com distância vertical entre dois planos consecutivos da metade de c . Na metade da distância entre dois planos formados pelos hexágonos de cálcio, há um plano formado por 3 grupos fosfatos (PO_4) e 3 cálcios, sendo que este plano é também perpendicular ao eixo c . Estes 3 fosfatos formam um triângulo equilátero enquanto que os 3 cálcios formam um outro triângulo equilátero, e estes dois triângulos são invertidos entre si. Notar que os triângulos de cálcios e de fosfatos são opostos entre si para um mesmo plano e invertidos no plano seguinte (A figura 15, na visão superior, mostra os triângulos de cálcio e de fosfato, no entanto a aparência hexagonal é dada por haver superposição de dois planos consecutivos). Na região

central temos as duas hidroxilas, também com distância vertical entre si de metade de c e com orientação paralela ao eixo c (figuras 14 e 15).

Figura 14. A figura mostra uma visão ao longo do eixo c do cristal de HAp, sendo destacado o hexágono de cálcio e a célula unitária tendo como origem o eixo das hidroxilas. Esferas brancas pequenas-H, esferas amarelas-P, esferas azuis-Ca e esferas vermelhas-O.

Figura 15. Visão lateral (figura a esquerda) e superior (figura a direita) dos hexágonos de cálcio. Notar que na metade da distância vertical (linha vermelha indica o eixo c) entre os planos dos hexágonos de cálcio se localiza os triângulos de cálcio e de fosfato, sendo estes invertidos entre si em um mesmo plano.

Os parâmetros de rede da estrutura cristalina são alterados nas bioapatitas sintéticas dependendo da impureza presente. Na HAp do tipo A verifica-se uma expansão^{32,33} do parâmetro de rede a enquanto que nas substituições do tipo B verifica-se uma contração deste mesmo parâmetro³³. Do ponto de vista biológico, observa-se que os grupos carbonatos não alteram a cristalinidade da HAp, mas

contribuem no sentido de acelerar os processos de dissolução da estrutura evidenciados nas cáries dentárias e nos processos de reabsorção óssea.

2.3. Esmalte dental.

O esmalte dental forma uma capa protetora, de espessura variável, sobre a superfície da coroa dental (figura 16). Devido ao seu alto conteúdo de sais minerais e seu arranjo cristalino, o esmalte constitui-se no tecido mais duro do organismo humano. Sua constituição é de cerca de 96% de material inorgânico e somente uma pequena parcela de 4% de material orgânico e água, sendo que o material inorgânico é basicamente formado por apatitas^{34,35}.

Figura 16. Desenho mostrando um corte transversal de um incisivo humano.
O esmalte corresponde à estrutura que recobre a coroa dental.

A estrutura do esmalte é dividida em prismas de esmalte, bainha de prismas e algumas regiões com uma substância interprismática cimentificante. Os prismas, que podem ser considerados como a unidade do esmalte, seguem um trajeto tortuoso a partir da junção dentino-esmalte no sentido da superfície dental. Na junção dentino-esmalte os prismas formam um ângulo de 90° com a dentina, e possui um diâmetro médio de cerca de 4µm, sendo que este diâmetro aumenta à medida que o prisma se afasta da dentina e se aproxima da superfície do esmalte.

Ao observar a estrutura microscópica do esmalte em corte transversal, nota-se um formato parecido com buraco de fechadura (figuras 17 e 18), sendo que a estrutura é dividida em duas regiões: prismas de esmalte formando uma região

chamada de cabeça ou corpo, onde os cristais de apatita possuem uma orientação paralela ao prisma e região interprismática, chamada de cauda, onde os cristais se desviam gradativamente do eixo do prisma. Os cristais de apatita constituem a unidade do prisma de esmalte quando visto em microscopia eletrônica.

A orientação dos cristais no interior dos prismas é dependente da região a ser analisada: no corpo do prisma a orientação dos cristais é paralelo ao longo eixo do prisma, enquanto que na cauda, os cristais se desviam do eixo do prisma, chegando até um ângulo de 65° com o mesmo e se abre no formato de leque, até encontrar o prisma vizinho; neste ponto de encontro ocorre a maior variação da direção de orientação dos cristais, pois os mesmos voltam a ter uma orientação paralela ao eixo do prisma (figuras 17 e 18).

Figura 17. Imagem de microscopia (5.000x) de cortes transversais dos prismas de esmalte humano.

Notar que as orientações dos cristais são diferentes nos corpos (B) do que nas caudas (T) enquanto que a estrutura lembra o formato de buraco de fechadura. (De Meckel, A. H., Griebstein, W. J. e Neal, R. J. : Arch. Oral Biol. 10:775, 1965)

Figura 18. Desenho do modelo de buraco de fechadura do esmalte humano, indicando a orientação dos cristais de apatita dentro dos prismas. A orientação dos cristais é paralela ao eixo do prisma na região de corpo e se abrem em leque formando ângulos de 65° na região das caudas. (Bhaskar S. N., Histologia e Embriologia Oral de Orban, Artes médicas, pag.54).

Figura 19. Corte transversal dos cristais de apatita dentro de um prisma de esmalte humano. Os cristais estão firmemente compactados e possuem um formato irregular. (168.000x) (Bhaskar S. N., Histologia e Embriologia Oral de Orban, Artes médicas, pag.54).

Figura 20. Micrografia eletrônica dos cristais do esmalte em corte transversal. A estrutura dos cristais aparece como umas linhas eletrodensas que se cruzam em um ângulo de 60°. (canto inferior esquerdo 2.300.000x - imagem maior 780.000x)
(Mjör I. A., Fejerskov O., Embriologia e Histologia Oral Humana, Salvat Editores AS, pag.63)

Os cristais estão altamente compactados no esmalte maduro e em corte transversal apresentam um formato irregular com 30 nm de espessura média e 90 nm de largura média (figura 19). O seu comprimento é estimado em cerca de 1µm, estimativa esta devido à alta dificuldade de se preparar uma seção que seja exatamente transversal ao prisma^{34,35}.

Ao examinar os cristais de apatita, em corte transversal, com uma resolução extremamente alta é possível visualizar a estrutura química dos cristais de apatita. Os cristais são compostos por estrias paralelas eletrodensas que se cruzam entre si formando um ângulo de 60° (Figura 20). Estas estrias possuem uma periodicidade de cerca de 0,9 nm e são denominadas de trama do cristal, aparecendo em consequência da repetição das células unitárias da hidroxiapatita, refletindo a sua disposição hexagonal.

Os cristais de HAp no esmalte dental possuem impurezas, sendo que o espectro de RPE usado em dosimetria, gerado por este material, tem sua origem nos

radicais carbonatos, que correspondem a um dos tipos de impurezas presentes nesta estrutura. A análise do esmalte por espectroscopia de RPE, além de ter utilidades de dosimetria, foi usada inicialmente para analisar o grau de alinhamento dos cristais de HAp e relacionar isto com a susceptibilidade as cáries^{10,11,12}.

2.4. RPE de bioapatitas e do esmalte dental.

O esmalte dental, ao ser analisado pelo método de RPE, produz um sinal complexo, o qual é atribuído a diversos centros paramagnéticos: O^- , O_3^- , CO_3^- , CO_3^{3-} , CO_2^- e CO^- . Alguns destes radicais iônicos são produzidos no interior do cristal de apatita a partir do CO_3^{2-} que substitui o radical OH^- (tipo A) ou o radical PO_4^{3-} (tipo B), enquanto outros são gerados devido à absorção de moléculas de CO_2 do ar¹⁰⁻¹⁶.

As radiações ionizantes (raios-x ou radiação gama) são os principais agentes geradores destes centros paramagnéticos no esmalte dental. Este fato faz com que o esmalte dental seja um dos materiais analisados durante a datação de fósseis e em dosimetria de pessoas expostas a estes tipos de radiação (seja em acidentes ou em pessoas que trabalham com radiação)².

As apatitas, material do qual o esmalte é constituído, tem sido sintetizadas e analisadas. O estudo das apatitas sintéticas possibilita além de uma melhor compreensão dos radicais do esmalte dental, uma vez que existe um certo controle sobre os mesmos durante a síntese, o desenvolvimento de um dosímetro de radiação com boa eficiência e eficácia.

Os primeiros trabalhos de RPE com esmalte dental datam de 1972 e foram feitos por Cevc P. et al¹⁰. Inicialmente foram citadas a forma complexa do sinal obtido e a variação das amplitudes das linhas em função da orientação do campo magnético nos eixos dos cristais do esmalte. O sinal foi atribuído ao CO_3^{3-} com simetria axial ($g_{\perp}=2,0036$ e $g_{\parallel}=1,9983$) presente na forma de impureza na estrutura cristalina da apatita. Em 1980 o mesmo autor elabora um trabalho tentando relacionar as amplitudes das linhas com o grau de alinhamento dos cristais de apatita.

Segundo o autor, após analisar vários incisivos centrais, o maior valor da relação entre as amplitudes dos sinais obtidos para o $g_{\perp}$ e o $g_{\parallel}$, seria um indicativo de maior grau de alinhamento dos cristais, o que conferiria maior resistência às cáries¹¹. Outros trabalhos se seguem mostrando que a relação entre as amplitudes não é simplesmente um indicativo de resistências às cáries, sendo que o valor desta relação é variável de acordo com o tipo de dente, sua posição na arcada dentária, local de onde se retira a amostra e também variável de indivíduo para indivíduo.

Em 1980 Doi Y. et al.¹² publica um estudo analisando o alinhamento dos cristais com um procedimento parecido com o que foi proposto por Cevc, no entanto com finalidade diferente. A finalidade seria tentar identificar a localização dos radicais CO_3^{3-} com simetria axial ($g_{\perp}=2,0029$ e $g_{\parallel}=1,9972$) dentro do cristal de apatita. Ainda neste ano, o sinal de RPE emitido por apatitas presentes em fósseis (ossos e dentes) passa a ser analisado de modo a fazer datações⁶.

A partir da metade da década de 80, pesquisadores começam a perceber que não é somente uma espécie paramagnética que produz o sinal de RPE no esmalte dental, sendo necessário, portanto, identificar e analisar os sinais separadamente. Além do radical CO_3^{3-} que já era conhecido, identificou-se também o radical $\text{CO}_2^{\cdot-}$, comparando os sinais obtidos do esmalte com sinais de apatitas sintéticas¹³.

Estudos seguintes, também feitos com apatitas sintéticas, permitiram identificar várias espécies paramagnéticas¹⁵⁻¹⁶, nas mais diversas posições, sendo que ficou evidente que o sinal obtido era alterado ao se modificar o modo de preparo das amostras, principalmente com o fator temperatura. Também foi observado que alguns destes sinais se intensificavam com o tempo de armazenamento, indicando que algumas destas espécies tinham origem da absorção de CO_2 da atmosfera.

Atualmente, o espectro de RPE obtido de amostras de esmalte, que é utilizado em aplicações de dosimétricas e nas datações arqueológicas, corresponde a uma superposição de sinais (ortorrômbico, axial e isotrópico) sendo que é possível correlacionar alguns deles com espectros obtidos em HAp sintéticas^{13,14,16,26,30,31}.

2.5. Dosimetria por RPE.

A dosimetria por RPE utiliza centros paramagnéticos como indicadores de dose. Estes centros são gerados pela radiação incidente, que ioniza os átomos do material gerando elétrons livres, que são capturados por impurezas ou defeitos presentes na rede cristalina. Os elétrons capturados dão origem aos centros paramagnéticos².

A vida média destes centros pode variar de algumas horas até milhões de anos. Para aplicações em datação de materiais geológicos e arqueológicos é necessário que o radical tenha uma vida média de $10^6 - 10^7$ anos, enquanto que para aplicações em dosimetria esta vida média pode ser menor.

Para que um centro paramagnético possa ser utilizado em dosimetria é necessário que satisfaça as seguintes condições: a) que tenha um tempo de vida muito maior que o tempo entre a irradiação e a medida de RPE feita na amostra; e b) que ao ser produzido pela radiação não sature no intervalo de dose de interesse.

A concentração de radicais paramagnéticos criados durante um processo de irradiação pode ser associada à área sob o sinal de ressonância ou a sua intensidade de pico a pico. Esta medida aumenta com a dose até atingir a saturação. A determinação da dose absorvida ou a dose acumulada em uma amostra sujeita a um processo de irradiação pode ser efetuada pelo “método das doses aditivas”^{2,6,27,30,31}.

O método das doses aditivas, desenvolvido por Ikeya², consiste em medir inicialmente o sinal de RPE da amostra irradiada com dose desconhecida. A seguir irradia-se a amostra com doses sucessivas de uma fonte calibrada, e mede-se o sinal de RPE após cada irradiação. Com a determinação da intensidade do sinal constrói-se o gráfico de crescimento do sinal de RPE com a dose de laboratório. Ajustando os pontos experimentais temos a curva de crescimento do sinal com a dose. Ao extrapolar esta curva até o eixo das doses, a dose inicial pode ser determinada medindo o tamanho do segmento extrapolado sobre o eixo das doses. A figura 21 exemplifica o método: as doses D1, D2, D3 e D4 foram aplicadas após a medida inicial, I0, e produziram as intensidades I1, I2, I3 e I4 respectivamente. Ao ajustar os valores obtidos em uma curva, o resultado foi uma variação linear, sendo que ao

extrapolar a reta teremos como DA a dose desconhecida que gerou o valor inicial I_0 antes das irradiações de laboratório.

Figura 21. Figura exemplificando o método das doses aditivas, sendo que DA indica a dose que é determinada após as sucessivas irradiações de laboratório.

Figura 22. Figura mostrando a variação do sinal de RPE com a dose de radiação para um material que satura na faixa de doses mostrada.

A precisão deste método depende do conhecimento do espectro da espécie paramagnética (principalmente seu tempo vida média e sua dose de saturação), da escolha da função para a extrapolação dos dados experimentais e das condições de irradiação da amostra no laboratório. Para o caso em que as doses aplicadas são consideravelmente menores que as doses de saturação do sinal de RPE, o ajuste pode ser feito por uma regressão linear, no entanto para doses próximas a saturação do

sinal, a extrapolação é geralmente efetuada com uma função exponencial² (figura 22).

3. Material e métodos.

3.1. Síntese da Hidroxiapatita do tipo B.

A HAp do tipo B, que possui os íons carbonatos no sítio do fosfato (PO_4^{3-}), foi sintetizada em meio aquoso, de acordo com o método usado por Vignoles et al.³⁶, utilizando-se as razões $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{PO}_4^{3-}]=0,83$ e $[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{PO}_4^{3-}]=1$ para as soluções:

Solução A: 2,36g de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ dissolvidos em 700ml de água destilada + 300 ml de solução de NH_3 ($d=0,92$; $\text{pH}=12,5$).

Solução B: 1,58g de fosfato dibásico de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ + 1,15g de carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$ dissolvido em 300 ml de água destilada.

A preparação foi efetuada segundo o procedimento:

1. A solução B foi adicionada lentamente, com o auxílio de uma bomba peristáltica (fluxo de 100 ml/h), à solução A, que mantida em um banho de óleo a 80°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) e sob agitação magnética constante. Terminada a adição, a mistura permaneceu sob a agitação a mesma temperatura, por mais duas horas.
2. Após a digestão, a mistura foi filtrada ainda quente em funil de Buckner. O sólido foi transferido para um béquer e o papel de filtro foi lavado com água quente e depois desprezado.
3. Posteriormente, o sólido foi agitado em um béquer com 250 ml de água, mantida a aproximadamente 80°C , por cerca de 20 minutos. A mistura foi filtrada em funil de Buckner. O sólido obtido foi transferido para um béquer e foi medido o pH do filtrado. Esta operação de lavagem foi repetida por três vezes. Finalmente, o sólido foi lavado no próprio funil de Buckner com

aproximadamente o mesmo volume de água fria. O pH do filtrado após a última lavagem foi de aproximadamente 7.

4. O sólido foi seco em estufa por vinte e quatro horas a temperatura de 100°C. o material seco foi peneirado em malha de 210 µm, e posteriormente mantido no dessecador.

As amostras foram preparadas modificando alguns dos procedimentos de síntese, para que com isto se obtivesse diferentes amostras com diferentes concentrações de carbonatos. A tabela 1 abaixo mostra as alterações feitas durante a síntese das amostras e o resultado obtido.

Tabela 1. tabela mostrando as alterações feitas durante a síntese das hidroxiapatitas do tipo B.

amostra	teor CO3%	temp. °C	pH	tempo de dig. (h)	veloc. de agitação	adição (ml/h)	conc. de reagente	Razão Ca/P obtida	teor CO3 obtido
CBE 3	1	70	7,0	1	rápida	250	máxima	1,80	1,44
CBE 5	1	70	7,0	4	rápida	70	máxima	1,68	1,04
CBE 8	1	95	11,0	1	Lenta	70	máxima	1,89	2,32
CBE 10	13	95	7,0	1	rápida	70	máxima	1,68	2,10
CBE 11	13	70	11,0	4	Lenta	70	máxima	1,85	7,25
CBE 16	13	95	11,0	4	rápida	250	máxima	2,14	14,15
CBE 17	7	83	9,0	2,5	média	160	média	1,82	6,67
CBE 18	7	83	9,0	2,5	média	160	média	1,93	7,22
CBE 19	7	83	9,0	2,5	média	160	média	1,94	6,95
CBE 20	7	83	9,0	2,5	média	160	média	1,92	7,10

Esta síntese foi realizada no Laboratório de Síntese de Fosfatos Cerâmicos, localizado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) – RJ, pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Alexandre Malta Rossi, sendo que este trabalho foi de responsabilidade do mesmo.

3.2. Preparação da amostra de esmalte dental.

Um primeiro pré-molar foi selecionado para preparação das amostras. A escolha se deu devido à boa condição do dente, sem a presença de tecido cariado ou cálculos aderidos a superfície dental.

Em um primeiro instante foi feita uma limpeza do dente com escova e água corrente, sendo que em seguida, o mesmo foi seco em papel toalha a temperatura ambiente. Em uma segunda etapa o dente foi cortado com o uso de uma serra diamantada com refrigeração feita com água, sendo separados pequenos blocos de esmalte da dentina.

Um destes blocos foi recortado com dimensões de 1,35 mm x 1,30 mm x 1,10 mm, de forma que as superfícies laterais fossem perpendiculares a superfície do esmalte (figura 23). Os outros blocos foram triturados em um recipiente de ágata após serem secos a temperatura ambiente. Após a trituração, os fragmentos de maiores dimensões foram recolhidos, sendo desprezados os que se apresentavam pulverizados.

Figura 23. Desenho a esquerda mostra o bloco de esmalte que foi retirado do dente e as suas dimensões, enquanto que o desenho a direita mostra os eixos de referência em relação ao dente.

As amostras, tanto o bloco quanto o esmalte triturado, foram irradiadas com uma dose de 120 Gy em uma fonte de ^{60}Co .

Para o estudo do bloco de esmalte, o mesmo foi colado a um tubo de quartzo e inserido na cavidade ressonante com um dos seus eixos na vertical. Em seguida o mesmo foi rotacionado em torno deste eixo, sendo medido, com ajuda de um

goniômetro construído para esta finalidade, o ângulo entre o campo magnético e um dos eixos perpendiculares ao eixo vertical. Este goniômetro foi construído de forma que se ajusta a sonda que leva o tubo de quartzo a cavidade ressonante e permite rotações em um único plano. O resultado é apresentado medindo-se a intensidade do sinal de RPE em função do ângulo indicado pelo goniômetro.

3.3. Espectrômetro banda-K.

Figura 24. Espectrômetro de Banda K. Vista geral mostrando os componentes e detalhe da cavidade ressonante. Provisoriamente a mesma está inserida em um saco plástico sendo constantemente purgada com nitrogênio gasoso seco.

O espectrômetro de Banda K é constituído por um eletroímã de 12 polegadas (Varian V-12), controlador de campo magnético (Bruker Field Controller BH-15), uma ponte de microondas (Bruker Microwave Controller ER 048 R e Bruker Microwave Bridge K-BAND ER 067 KG), freqüencímetro (Hewlett Packard 53151), amplificador lock-in (EG&G 7220) e cavidade cilíndrica (figura 24). Esses equipamentos são controlados por um microcomputador Pentium através de placas GPIB (General Purpose Interface Board) e software escrito em ambiente HP-VEE.

Esse software permite ao usuário a escolha dos parâmetros de aquisição do espectro: número, tempo e largura de varreduras, intensidade e frequência de modulação. A sensibilidade do amplificador lock-in é ajustada automaticamente, de acordo com o sinal de entrada. O valor da frequência de microondas é lida e registrado em arquivo. Os dados do espectro são mostrados durante sua aquisição podendo cancelar a varredura atual durante um processo de média de espectros. É mostrada também a média entre várias varreduras. Essas características contribuem para a obtenção de espectros com melhor relação sinal/ruído.

3.4. Irradiação.

Figura 25. Fotografia do equipamento de radioterapia do Hospital das Clínicas da FMRP, usado para a irradiação das amostras de apatitas do tipo B e esmalte dental.

A irradiação das amostras, tanto das apatitas do tipo B quanto do esmalte, foi realizada utilizando uma unidade de ^{60}Co para teleterapia Gammatron-S Siemens que está localizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Figura 25). A calibração é feita segundo o protocolo de calibração da Agência

Internacional de Energia Atômica (1987) pelo grupo de física médica da Unidade de Radioterapia do mesmo hospital. As amostras foram colocadas sobre a cama do aparelho, centradas em um campo de $10 \times 10 \text{ cm}^2$ na distância de 80cm da fonte. Um dispositivo de acrílico foi colocado sobre as amostras em uma espessura devidamente determinada para garantir a condição de equilíbrio eletrônico.

3.5. Seleção das amostras de HAp do tipo B.

As amostras foram preparadas modificando alguns dos procedimentos de síntese, para que com isto se obtivesse diferentes tipos e diferentes concentrações de carbonatos. Para selecionar as amostras que tivessem um espectro mais apropriado para a dosimetria realizou-se o seguinte procedimento: primeiramente aplicou-se, de modo simultâneo, uma dose de 40 Gy de radiação (fonte de ^{60}Co) em todas as amostras, para em seguida realizar medidas padronizadas com as mesmas. As amostras que tivessem o espectro mais simples de ser analisado e com maior amplitude seriam as amostras mais promissoras para serem utilizadas em dosimetria.

Os parâmetros usados nas medidas foram: potência de microondas em 10mW; amplitude de modulação em 1 gauss; sensibilidade de 1 mV; intervalo de varredura em 90 gauss, frequência de modulação em 51,333 kHz; constante de tempo de 0,5 s; 10 varreduras em um intervalo de 2 minutos para cada varredura.

O resultado obtido pode ser visto no gráfico da figura 26 onde se mostra um comparativo entre os espectros das diversas amostras. A amostra que se mostrou mais indicada é a CBE10, por possuir um espectro mais simples (após a simulação indicou uma única componente) e possuir, em condições iguais, uma maior amplitude.

Da amostra CBE10 foram separados 9 lotes de cerca de 20 mg cada, sendo cada um destes lotes foi irradiado, em uma fonte de ^{60}Co , com uma dose. As doses usadas para a análise dosimétrica foram, medidas em Gy, de 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20; 40.

Figura 26. Gráfico mostrando os espectros das diversas amostras de HAp do tipo B para comparação. A escala utilizada é a mesma em todos os espectros.

3.6. Seleção dos parâmetros de operação do espectrômetro de RPE.

Uma vez selecionada a amostra que possui o melhor espectro para a dosimetria, o próximo passo foi à otimização dos parâmetros de operação do espectrômetro em banda-K e o teste de reprodutibilidade. Para este trabalho utilizou-se a mesma amostra selecionada.

Os parâmetros otimizados nesta fase foram utilizados durante as medidas quantitativas, sendo que os mesmos foram analisados levando-se em conta o melhor espectro obtido, ou seja, a obtenção de uma maior amplitude sem, contudo, deformar a forma das linhas.

3.6.1. Potência de microondas.

Para selecionar a potência de microondas utilizou-se 6 mg da amostra CBE10 irradiada com 40 Gy. A amplitude de modulação foi de 1 gauss e o campo de varredura 60 gauss. A variação da amplitude do espectro obtido foi plotada em função da raiz quadrada da potência de microondas utilizada, sendo que a potência escolhida foi aquela que proporciona maior amplitude de sinal sem atingir a condição de saturação.

Esta análise apontou que a potência a ser usada deve ter cerca de 20 mW, como mostra o gráfico da figura 27.

Figura 27. Gráfico da amplitude do sinal de RPE em função da raiz quadrada da potência. A análise do gráfico mostra que a potência a ser utilizada é de aproximadamente 20 mW.

3.6.2. Amplitude de modulação do campo magnético.

A amplitude de modulação influencia tanto a largura de linha quanto à intensidade do sinal de RPE. Para amplitudes de modulação pequenas a intensidade

do sinal aumenta de forma linear, no entanto, para amplitudes de modulação altas, a largura de linha começa a sofrer uma distorção e a intensidade do sinal passa a diminuir. Segundo Poole¹⁹, para distorções menores que 1% é necessário que a amplitude de modulação seja menor que cerca de 1/3 da largura de linha de pico a pico ($H_m < 1/3 \Delta H_{pp}$), havendo algumas pequenas variações segundo as formas das linhas: Lorentzianas e Gaussianas.

Para a determinação da amplitude de modulação ideal, ou seja, a que produz maior amplitude sem deformar significativamente a linha, utilizou-se uma comparação das larguras de linhas dos espectros obtidos para diferentes amplitudes de modulação, normalizados pelo espectro de menor amplitude (figura 28), e o resultado da simulação do sinal (figura 29).

Observando a figura 28, nota-se que com amplitudes de modulação maiores que 3 gauss, a largura da linha já começa a aumentar, indicando o início da sobremodulação. Os valores utilizados na simulação (figura 29), são mostrados na tabela 2 e indicam larguras de linhas entre 4 e 4,3 gauss, o que permite uma amplitude de modulação de 1,4 gauss (utilizando o parâmetro dado por Poole).

Figura 28. Gráfico mostrando os espectros obtidos para diferentes amplitudes de modulação. Para comparar melhor a distorção na largura da linha, os espectros foram normalizados em função do obtido com amplitude de 0,5 gauss.

Figura 29. Espectro experimental comparado com o espectro simulado, da HAp do tipo B (amostra CBE10), irradiada com dose de 40 Gy. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Tabela 2. Tabela indicando os valores usados para a simulação do espectro da amostra CBE10, de HAp do tipo B, irradiada com 40 Gy.

linha	gx	gy	gz	larg-x	larg-y	larg-z	Gau/Lor
ortorrômbica	2,00313	2,00262	1,99745	4,00	4,30	4,30	0,98G

O valor utilizado nas medidas experimentais foi de 2 gauss, pois conforme o que foi mostrado, obtêm-se uma maior amplitude sem deformar de forma significativa a linha.

3.6.3. Posicionamento da amostra e reprodutibilidade do sinal.

O posicionamento da amostra dentro da cavidade ressonante é o ponto mais crítico da dosimetria por RPE. Caso o posicionamento da amostra não seja o mesmo em todas as medidas, poderão ocorrer diferenças quantitativas entre as amplitudes

dos espectros obtidos. No caso do espectrômetro de banda-K este problema é mais grave que no espectrômetro de banda-X, pois devido maior sensibilidade é mais difícil de se obter a reprodutibilidade.

Figura 30. Gráfico mostrando os espectros obtidos no teste de reprodutibilidade, sendo que as respectivas amplitudes estão indicadas na tabela 1.

Para se testar a reprodutibilidade do sinal realizou-se por 10 vezes a medida de uma amostra irradiada com 40 Gy, sendo que estas medidas foram feitas em dias diferentes, sempre colocando o aparelho o mais próximo possível das condições da primeira medida (tamanho da cavidade, fase, íris, sensibilidade). A figura 30 mostra os espectros obtidos e nota-se que não há grande variação entre eles. A tabela 3 mostra as amplitudes obtidas, a média de 0,705747326 u.a., o desvio padrão que foi de 0,017365 u.a., ou seja, cerca de 2,46% da média e a maior variação obtida (a diferença entre as amplitudes das medidas 1 e 7), equivalente a 0,0429687 u.a., ou seja, 6,09% da média.

Tabela 3. tabela indicando as amplitudes obtidas nas medidas feitas no teste de reprodutibilidade.

Medida	Amplitude (10e-4 u.a.)
1	0,72733449
2	0,72482880
3	0,69491589
4	0,72146384
5	0,72639473
6	0,69507937
7	0,68436579
8	0,68696604
9	0,70312821
10	0,69299610
média = 0,705747326	
desvio padrão = 0,017365	
maior desvio = 0,0429687	

Com o resultado obtido pode-se concluir que medidas quantitativas podem ser realizadas com o espectrômetro em banda-K, desde que se tenha uma sistematização de como realiza-las, ou seja, sempre utilizar os mesmos parâmetros. A máxima diferença obtida de 6,09% pode ser reduzida caso o aparelho seja manipulado de forma ininterrupta, com a mesma finalidade, isto faz com que a reprodutibilidade dos parâmetros de medidas sejam mais facilmente obtidas.

4. Resultados e discussões.

4.1. Análise do espectro do esmalte dental em banda-K.

Ao realizar o estudo de espectroscopia em banda-K do esmalte dental utilizou-se parâmetros para o aparelho abaixo dos valores que seriam ótimos para a HAp do tipo B (conforme foi mostrado no capítulo de materiais e métodos), isto foi possível devido à alta dose de radiação utilizada (120 Gy). A potência do aparelho foi de 1mW, a amplitude de modulação de 1,5 gauss, a frequência de modulação de 53,3kHz e a sensibilidade de 2mV.

A análise do espectro do esmalte triturado, obtido em um espectrômetro em banda K (figuras 31 e 32), apresentou 4 sinais distintos, sendo que após uma simulação computacional os mesmos foram atribuídos a um radical orgânico, a um radical de simetria ortorrômbica e mais dois de simetria axial (tabela 4). O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Tabela 4. Tabela mostrando os parâmetros usados na simulação da amostra de esmalte triturada.

linha	gx	gy	gz	Larg-x	Larg-y	larg-z	Gau/Lor
orgânico	2,00485	2,00485	2,00485	10,00	10,00	10,00	0,5G
Axial-1	2,00100	2,00100	2,00050	2,50	2,50	2,50	0,5G
ortorrômbico	2,00340	2,00200	1,99730	3,30	3,30	3,30	0,5G
Axial-2	2,00290	2,00290	1,99730	3,90	3,90	3,90	0,5G

Figura 31. Gráfico mostrando o resultado obtido pela simulação das 4 componentes do espectro do esmalte dental e sua soma.

Figura 32. Comparação do espectro obtido pela soma das componentes simuladas com o espectro experimental obtido em banda-K. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

A comparação do resultado deste trabalho com resultados presentes na literatura^{13,14,26,30} permite a identificação dos radicais que originam as componentes do espectro: o sinal orgânico coincide com o resultado usado por Vanhaelewyn et al.³⁰ em trabalho de dosimetria de radiação usando espectrômetro de banda-X; as componentes axial-2 e ortorrômbica, além de coincidir com o resultado de Vanhaelewyn et al.³⁰, ainda são mencionadas por Callens et al.^{13,14} e por Schramm e Rossi²⁶ quando analisando HAp sintéticas e são atribuídas ao radical CO_2^- , sendo que o radical que gera a componente axial-2 está presente no sítio A e o que gera a ortorrômbica no sítio B; a componente axial-1 não é mencionada pelos trabalhos acima.

O resultado obtido com análise angular do bloco de esmalte é similar ao realizado por Doi et al.¹² em banda-Q. A figura 33 indica os eixos de referência adotados em relação à superfície do esmalte e a figura 34 indica a intensidade do sinal obtido em função do ângulo medido pelo goniômetro, para rotações em torno dos 3 eixos da amostra.

O sinal 1, de maior amplitude, corresponde a medida da amplitude na região onde se superpõe os sinais de $g_{\perp}$ da componente axial-2 e g_x e g_y da componente ortorrômbica. Com o auxílio dos gráficos mostrados na figura 35, pode-se concluir que a direção preferencial do $g_{\perp}$ da componente axial-2 (menor amplitude na simulação) é perpendicular a superfície do esmalte, enquanto que, a direção preferencial do g_x e/ou do g_y (pela resolução não é possível distinguir) é paralela a superfície do esmalte. Pode-se observar que o sinal 2, correspondente aos espectros de $g_{\parallel}$ da componente axial-2 e g_z da componente ortorrômbica, é complementar ao obtido na análise do sinal 1, ou seja, a direção preferencial do $g_{\parallel}$ da componente axial-2 é paralela a superfície do esmalte, enquanto a direção preferencial do g_z , da componente ortorrômbica, é perpendicular a superfície do esmalte. O sinal 3, de menor intensidade, é gerado pela componente axial-1 e possui forte influência das variações que ocorrem no sinal 1, no entanto, apesar de não ser conclusivo, acreditamos que a direção preferencial do $g_{\parallel}$ desta componente seja perpendicular a superfície do esmalte.

Figura 33. Desenho mostrando os eixos de referência do bloco de esmalte analisado em relação à superfície do esmalte e suas dimensões

Figura 34. Gráficos mostrando a variação da amplitude do sinal em função do ângulo entre o campo magnético e os eixos da amostra.

Figura 35. Gráficos mostrando a diferença entre os espectros obtidos durante as rotações.

A rotação no plano paralelo a superfície do esmalte também produz uma variação de amplitude, mas com menor intensidade. Esta variação gera grande dúvida quanto a sua origem, principalmente pelo fato de acontecer de forma acentuada somente sobre o sinal 1. Sabe-se que os prismas de esmaltes possuem uma direção preferencial perpendicular a superfície do esmalte e os cristais de apatitas possuem o eixo c paralelo a orientação dos prismas; sendo que os outros dois eixos, a e b, se distribuem de modo aleatório perpendicularmente a esta direção (ver item 2.3). Como os eixos a e b dos cristais de apatitas se distribuem de modo aleatório no plano paralelo a superfície do esmalte, se esperaria pouca ou nenhuma variação de amplitude nesta rotação (esperava-se uma isotropia ao neste plano). A justificativa desta variação talvez esteja no fato da direção preferencial do g_x e/ou do g_y (pela resolução não é possível distinguir) ser paralela ou inclinada a superfície do esmalte,

somente na região de onde se retirou a amostra (região cervical), no entanto isto não é conclusivo.

Apesar dos problemas na análise do resultado, ele se apresenta superior ao apresentado por Doi et al.¹² em banda-Q, pois apresenta uma componente não identificada (axial-1) e mostra uma variação angular da intensidade durante a rotação no plano paralelo a superfície do esmalte.

Callens et al.^{13,14} e Schramm e Rossi²⁶ relatam uma componente isotrópica com fator $g = 2,0007$ ao analisar apatitas sintéticas, sendo que esta componente pode corresponder a componente que aqui é apresentada como axial-1. Esta diferença de análise pode ser atribuída aos fatos: a) os trabalhos foram realizados com amostras em pó; b) a largura de linha deste sinal é pequena comparada com as demais e; c) os fatores $g_{\parallel}$ e $g_{\perp}$ são muito próximos um do outro.

O resultado, além de coincidente com resultados presentes na literatura, indica fatores que ainda não foram observados, como por exemplo, a isotropia da componente axial-1. Estas observações mostram que o espectrômetro em banda-K possui uma boa resolução no espectro, fato este que possibilita o seu uso de modo mais sistemático, abrindo a possibilidade de trabalhos de dosimetria e de datação.

A principal vantagem do espectrômetro em banda-K sobre o espectrômetro em banda-X corresponde a resolução superior mesmo empregando pouca quantidade de amostra, lembrando que esta melhor resolução possibilita a análise das componentes do sinal em separado e de modo mais detalhado.

Trabalhos com blocos de esmalte dental, utilizando potências diferentes poderão ser realizados no futuro de forma a confirmar a isotropia da componente axial-1.

4.2. Análise dosimétrica da HAp do tipo B.

Dentre as amostras analisadas, a CBE10 foi a que apresentou melhor desempenho para o uso em dosimetria. O seu espectro pode ser simulado em apenas uma componente ortorrômbica, e dentre as outras amostras, a amplitude de seu

espectro, para uma mesma dose de 40 Gy, foi a maior. A figura 36 mostra o espectro da amostra CBE10 irradiada com 40 Gy e o espectro simulado. A tabela 5 mostra os parâmetros usados na simulação.

Tabela 5. Tabela indicando os valores usados para a simulação do espectro da amostra CBE10, de HAp do tipo B, irradiada com 40 Gy.

Linha	gx	gy	gz	Larg-x	larg-y	larg-z	Gau/Lor
ortorrômbica	2,00313	2,00262	1,99745	4,00	4,30	4,30	0,98G

Figura 36. Espectro experimental comparado com o espectro simulado, da HAp do tipo B (amostra CBE10), irradiada com dose de 40 Gy. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Os parâmetros do espectrômetro em banda-K usados para a análise dosimétrica da amostra foram: potência de 20 mW, amplitude de modulação de 2 gauss, sensibilidade de 2mV e frequência de modulação de 53,3kHz. Todas as medidas foram feitas com uma quantidade de 5mg de amostra com precisão de $\pm 0,1$ mg, sendo que o espectro utilizado foi obtido com a média de 20 varreduras num intervalo de 100 gauss. A constante de tempo foi de 0,5s e o tempo de varredura de 2 minutos, gerando espectros com 120 pontos.

Para montar a reta de regressão linear das doses sobre a amostra, utilizou-se do fato que a área sob a curva de absorção das microondas é proporcional a

quantidade de centros paramagnéticos da amostra, sendo que a quantidade de centros paramagnéticos é proporcional a dose de radiação.

Feita a normalização do espectro simulado com o espectro experimental, monta-se a integral do primeiro e em seguida calcula-se a área sob a curva. A figura 36 mostra a comparação entre o espectro experimental e o espectro simulado e a figura 37 mostra a curva de absorção das microondas obtida pela integral da curva simulada e o valor obtido pelo cálculo da área. O procedimento é repetido para os espectros das diversas doses e a tabela 6 mostra os valores obtidos pelo cálculo das áreas. O espectro de RPE simulado foi integrado por métodos computacionais (somando a área de diversos trapézios) para obtenção da curva de absorção de microondas e a partir desta curva se calculou a área. O uso do espectro simulado é preferível por não conter ruídos.

Figura 37. Espectro de absorção de microondas obtido pela integral do espectro de RPE simulado.

A curva obtida pela comparação da área sob a curva de absorção e a dose aplicada à amostra está indicada no gráfico da figura 38, e possui uma boa correlação linear, conforme está mostrado no mesmo gráfico, por meio de uma reta de regressão linear. As barras colocadas nos pontos mostrados no gráfico indicam uma variação de 6,09%, valor que foi obtido pelo teste de reprodutibilidade do sinal.

O resultado obtido mostra que apesar das variações que aparecem na reta é possível fazer o estudo de dosimetria de radiação utilizando um espectrômetro em

banda-K, e para isto usa-se quantidades menores de amostra que a necessária para a dosimetria em espectrômetro em banda-X (a quantidade de spins necessária para a medida é inversamente proporcional ao quadrado da frequência de microondas¹⁹). Nota-se que apenas a dose de 15Gy possui um desvio da reta de regressão linear maior que 6,09%.

Tabela 6. Tabela relacionando a área sob a curva de absorção de microondas com a dose irradiada na amostra CBE10, usados na construção do gráfico da figura 38.

Dose (Gy)	Área sob a curva de absorção (u.a.)
0	8,7540E-04
0,5	8,9327E-04
1	9,7027E-04
2	9,9997E-04
3	1,1500E-03
5	1,2200E-03
10	1,6000E-03
15	1,7400E-03
20	2,2400E-03
40	3,5600E-03

Figura 38. Gráfico mostrando a correlação entre a dose aplicada à amostra de HAp tipo B e a área sob a curva de absorção de microondas. O gráfico ainda mostra a reta de regressão linear construída a partir dos 10 espectros experimentais realizados.

Um problema que é enfrentado na dosimetria com o uso desta amostra é o fato da mesma possuir um sinal residual (sem nenhuma dose de radiação). Este problema dificulta o uso da mesma no método das doses aditivas. A solução deste problema pode ser obtida de duas formas. A primeira é realizar a subtração do sinal residual de todas as medidas feitas, inclusive da que determina a dose residual. A segunda solução seria confeccionar dois dosímetros simultaneamente, sendo que um é exposto à radiação e o outro não; o método das doses aditivas é então aplicado no dosímetro que não foi exposto sendo que a dose que se pretende determinar é obtida pela comparação dos espectros dos destes dois dosímetros. A segunda solução é mais prática que a primeira pois permite que com o uso do método das doses aditivas uma única vez, seja possível fazer diversas comparações posteriores, bastando para isto não confeccionar somente dois dosímetros e sim vários.

Uma vantagem deste sinal de fundo está no fato de permitir medidas de doses baixas, pois qualquer dose produz um aumento do número de centros paramagnéticos que por sua vez são detectados pelo espectrômetro de RPE. Na ausência do sinal de fundo a relação sinal-ruído dificulta a detecção de espectros com baixas doses. Contudo deve-se tomar cuidado com o erro dado pelo teste de reprodutibilidade, que pode ser superior a diferença percentual entre os espectros obtidos em baixas doses.

Um modo de se fazer uma estimativa da menor dose que se pode medir é calcular 6,09% da área obtida pela integral do sinal residual e a partir deste resultado determinar o acréscimo de dose de radiação equivalente. Utilizando a reta de regressão linear da figura 38, obtém-se um valor de 800mGy para o acréscimo de dose, sendo que este acréscimo gera um crescimento relativo na área de $5,3312 \times 10^{-5}$ u.a., ou seja, 6,09% do sinal residual ($8,7540 \times 10^{-4}$ u.a.).

Outro fato observado corresponde a não correlação dos parâmetros utilizados na simulação do espectro de RPE da amostra com parâmetros presentes na literatura, isto pode ser explicado pelo fato da amostra ter sido sintetizada de um modo diferente do original, podendo com isto ter gerado um tipo de impureza com características um pouco diferentes das impurezas presentes nas amostras que foram até então analisadas.

Futuros trabalhos com outros tipos de hidroxiapatitas sintéticas podem levar a obtenção de amostras com melhores propriedades dosimétricas que a amostra

analisada neste trabalho, ou seja, com a mesma quantidade de amostra, após uma determinada dose de radiação, o número de centros paramagnéticos gerados é maior. Além disto, o uso do espectrômetro em banda-K, para a análise destes outros tipos de hidroxiapatitas pode ajudar a elucidar as variações sofridas no cristal devido à inclusão dos carbonatos, como por exemplo, a sua orientação e posição.

5. Conclusões.

No presente trabalho foi mostrado a utilização de um espectrômetro de RPE operando em banda-K para realização de medidas de dosimetria de radiação e análise do alinhamento cristalino no esmalte dental.

O resultado obtido para a espectroscopia do esmalte dental nos mostrou uma boa similaridade com espectros relatados na literatura, sendo que ainda foi detectada uma nova componente. Isto mostra que o espectrômetro é confiável e fornece uma boa resolução.

Analisando o resultado obtido com o estudo das propriedades dosimétricas da amostra CBE10, de HAp do tipo B, para a qual o espectrômetro em banda-K também se mostrou eficiente, conjuntamente com o resultado obtido na análise do esmalte dental, pode-se concluir que uma das vantagens deste aparelho sobre o espectrômetro em banda-X é a possibilidade de se fazer dosimetria com boa resolução do espectro, inclusive com a possibilidade de interpretar as componentes do sinal separadamente.

A quantidade de amostra utilizada no trabalho de dosimetria corresponde a um dos pontos mais positivos: com apenas 5mg foi possível estimar um limite de dose em 800 mGy. A comparação deste resultado com os obtidos com outros espectrômetros mostra algumas vantagens: o espectrômetro em banda-X necessita de maior quantidade de massa enquanto que em banda-Q a pouca reprodutibilidade das medidas dificulta procedimentos de dosimetria.

Outro ponto positivo foi o erro máximo estimado: baseado nos testes de reprodutibilidade o erro relativo foi de $\pm 3,0\%$, uma vez que a máxima variação foi de 6,09%. Este resultado, apesar de um pouco elevado quando comparado com medidas realizadas em banda-X, pode ser considerado satisfatório.

Problemas com a reprodutibilidade do sinal são críticos, no entanto, com o uso exclusivo de um espectrômetro com esta finalidade, os mesmos tendem a diminuir. O resultado mostrado aqui, o qual teve uma variação máxima de 6,09%, foi obtido fazendo medidas em dias separados, sendo que neste intervalo o aparelho foi usado com outras finalidades. Caso o aparelho tenha unicamente a finalidade de dosimetria, acredita-se que o resultado seja bem melhor, inclusive melhorando o limite de detecção, que neste trabalho foi estimado em 800 mGy.

Os diversos usos do espectrômetro se justificam, principalmente, devido ao seu alto custo, no entanto, em um futuro próximo, com o incremento do uso desta frequência, estes custos poderão ser reduzidos, e aparelhos com finalidade exclusiva em dosimetria poderão ser produzidos.

O problema de existir um sinal nativo na amostra pode se tornar uma vantagem, pois em baixas doses o ruído pode atrapalhar a correta análise do sinal, no entanto, com a existência deste sinal, a detecção em baixas doses pode ser feita de modo mais confiável, bastando para isto que o erro indicado pela reprodutibilidade seja de menor tamanho que o incremento do sinal obtido pelo aumento da dose.

Como conclusão final pode-se falar que o uso do espectrômetro em banda-K, quando sistematizado, poderá oferecer muitas vantagens sobre as técnicas de dosimetria hoje disponíveis: além de possibilitar o uso de dosímetros que acumulam dose de radiação, o espectrômetro em banda-K possui uma sensibilidade maior que o espectrômetro em banda-X, mostrando uma resolução melhor com menor quantidade de amostra.

6. Bibliografia.

1. MAHESH K., VIJ D.R.; **Techniques of Radiation Dosimetry**. 1 ed. New Delhi: Wiley Eastern Limited, 1985.
2. IKEYA M.; **New Applications of Electron Spin Resonance** – Dating, Dosimetry and Microscopy. 1ed. Singapore: World Scientific, 1993.
3. REGULLA D.F., DEFFNER U.; Dosimetry by electron-spin-resonance Spectroscopy of Alanine. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. - 33 (11), 1101, 1982.
4. CHEN F., COVAS D.T., BAFFA O.; Dosimetry of Blood Irradiation Using an Alanine/ESR Dosimeter. *Applied Radiation and Isotopes*. – 55 (1), 13-16, 2001.
5. KUDYNSKI R., KUDYNSKA J., BUCKMASTER H.A.; The Application of EPR Dosimetry for Radiotherapy and Radiation Protection. *Applied Radiation and Isotopes*. – 44 (6), 903-906, 1993.
6. IKEYA M., MIKI T.; Electron spin resonance dating of animal and human bones. *Science* – 207, 977-979, 1980.
7. IKEYA M., MIYAJIMA J., OKAJIMA S.; ESR dosimetry for atomic bomb survivors using shell buttons and tooth enamel. *Jpn. J. Appl. Phys.* – 23, 699-701, 1984.
8. ISHII H., IKEYA M., OKANO M.; ESR Dosimetry of Teeth of Residentes Close to Chernobyl Reactor Accident. *J. Nucl. Sci. Techn.* – 27, 1153-1155, 1990.
9. KAY M. I., YOUNG R. A., POSNER A. S.; Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* – 204, 1050-1052, 1964.
10. CEVC P., SCHARA M., RAVNIK C.; Electron-Paramagnetic Resonance Study of Irradiated Tooth Enamel. *Radiation Research* – 51 (3), 581-589, 1972.

11. CEVC G., CEVC P., SCHARA M., SKALERIC U.; The Caries Resistance of Human-Teeth is Determined by the Spatial Arrangement of Hydroxyapatite Micro-Crystals in the Enamel. *Nature* – 286, 425-426, 1980.
12. DOI Y., AOBA T., MORIWAKI Y., OKAZAKI M., TAKAHASHI J.; Orientations of Carbonate Ions in Human Tooth Enamel Studied With Use of the CO_3^{3-} Radical Ions as Probes. *Journal of Dental Research* – 59 (9), 1473-1477, 1980.
13. CALLENS F.J., VERBEECK R.M.H., NAESSENS D.E., MATTHYS P.F.A., BOESMAN E.R.; Effect of Carbonate Content on the ESR-Spectrum Near $g = 2$ of Carbonated Calciumapatites Synthesized from Aqueous-media. *Calcified Tissue International* – 44 (2), 114-124, 1989.
14. CALLENS F.J., VERBEECK R.M.H., NAESSENS D.E., MATTHYS P.F.A., BOESMAN E.R.; The Effect of Carbonate Content and Drying Temperature on the ESR-Spectrum Near $g=2$ of Carbonated Calciumapatites Synthesized from Aqueous-media. *Calcified Tissue International* – 48 (4), 249-259, 1991.
15. MOENS P.D.W., CALLENS F.J., VERBEECK R.M.H., NAESSENS D.E.; An EPR-Spectrum Decomposition Study of Precipitated Carbonated Apatites (NCAP) Dried at 25-degrees-c - Adsorption of Molecules from the Atmosphere on the Apatite Powders. *Applied Radiation and isotopes* – 44, 279-285, 1993.
16. CALLENS F., MOENS P., VERBEECK R.; An EPR Study of Intact and Powdered Human Tooth Enamel Dried at 400-degrees-c. *Calcified Tissue International* – 56 (6), 543-548, 1995.
17. SWARTZ, HAROLD M.; **Biological applications of electron spin resonance**. 1 ed. New York: Wiley-Interscience, 1972.
18. WERTZ, JOHN E.; **Electron Spin Resonance – Elementary Theory and Practical Applications**. 1 ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1972.
19. POOLE, CHARLES P.; **A comprehensive Treatise on Experimental Techniques**. 2 ed. New York: Wiley-Interscience, 1983.
20. YAMAGUCHI K., HIRANO T., YOSHIDA G., IWASAKI K.; Degradation-resistant character of synthetic hydroxyapatite blocks filled in bone defects. *Biomaterials* – 16: (13) 983-985, 1995.

21. LASSERRE A., BAJPAI P.K.; Ceramic drug-delivery devices. *Critical Reviews in Therapeutic Drugs Carrier Systems* – 15: (1) 1-56, 1998.
22. RUPPRECHT R.D., HORNING G.M., TOWLE H.J.; A clinical evaluation of hydroxyapatite cement in the treatment of Class III furcation defects. *Journal of Periodontology* – 72: (10) 1443-1450, 2001.
23. MANJUBALA I., SIVAKUMAR M., SURESHKUMAR R.V., SASTRY T.P.; Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *Journal of Biomedical Materials Research* – 63: (2) 200-208, 2002.
24. SCHAUER D.A., DESROSIERS M.F., LE F.G., SELTZER S.M., LINKS J.M.; EPR dosimetry of cortical bone and tooth enamel irradiated with X and gamma rays: study of energy dependence. *Radiation research* – 138, 1-8, 1994.
25. OLIVEIRA L.M., De JESUS E.F., ROSSI A.M., LOPES R.T., RODRIGUES L.N., BARBOSA R.A.; Energy dependence of EPR signal in synthetic and biological hydroxyapatite irradiates with photons. *Rad. Protection Dosimetry* – 84: (1-4) 511-514, 1999.
26. SCHRAMM D.U., ROSSI A.M.; Electron spin resonance (ESR) studies of CO_2^- radicals in irradiates A and B-type carbonate-containing apatites. *Applied Radiation and isotopes* – 52, 1085-1091, 2000.
27. MASCARENHAS S., BAFFA O., IKEYA M.; Electron Spin Resonance Dating of Human Bones From Brazilian Shell-Mounds (Sambaquís). *American Journal of Physical Antropology* – 59, 413-417, 1982.
28. VUGMAN N. V., ROSSI A. M., RIGBY S. E. J.; EPR Dating CO_2^- Sites in Tooth Enamel Apatites by ENDOR and Triple Resonance. *Appl. Radiat. Isot.* – 46, 311-315, 1995.
29. ROMANYUKHA A. A., DESROSIERS M. F., REGULA D. F.; Current issues on EPR dose reconstruction in tooth enamel. *Appl. Radiat. Isot.* – 52, 1265-1273, 2000.
30. VANHAELEWYN G., AMIRA S., DEBUYST R., CALLENS F., GLORIEUX Th., LELOUP G., THIERENS H.; A Critical discussion of the 2nd Intercomparision on Electron Paramagnetic Resonance Dosimetry with Tooth Enamel. *Radiation Measurements* – 33, 417-426, 2001.

31. GUALTIERE G., COLACICCHI S., SGATTONI, R., GIANNONI M.; The chernobyl accident: EPR dosimetry on dental enamel of children. *Appl. Rad. And Isotopes* – 55, 71-79, 2001.
32. YASUSHI SUETSUGU, YASUHIKO TAKAHASHI, FUJIO P. OKAMURA, JUNZO TANAKA; Structure Analises of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Cristal X-Ray Diffraction Method. *Journal of Solid State Chemistry* – 155, 292-297, 2000.
33. LIANA MACEDO DE OLIVEIRA; **Estudo por Ressonância Paramagnética eletrônica de Propriedades Dosimétricas em Hidroxiapatitas Carbonatadas Sintéticas do tipo-A**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 1999.
34. BHASKAR, S.N.; **Histologia e embriologia oral de orban** [Trad] Nilson Dias Martello. 10ª ed. São Paulo: Artes Medicas, 1989.
35. MJOR I. A., FEJERSKOV O.; **Embriologia e histologia oral humana**. 1ª ed. São Paulo: Medica Panamericana, 1990.
36. VIGNOLES M., BONEL G., HOLCOMB D.W.; Influence of Preparation Conditions on the Composition of Type B Carbonated Hydroxyapatite and on the Localization of the Carbonate Ions. *Calcif. Tissue Int.* – 43, 33-44, 1988.