AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de
fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca
multilaminada**

Carolina Benetti

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2014**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de
fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca
multilaminada**

Carolina Benetti

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise maria Zezell**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de
fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca
multilaminada**

Carolina Benetti

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise maria Zezell**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

Aos meus avós,

Maria de Lourdes S. Bovo,

Oswaldo Bovo,

Maria A. Benetti (in memorian),

Bruno A. Benetti (in memorian),

*Pois a vida é mais divertida quando se
tem avós.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Regina Maria Bovo e Paulo Andrea Benetti, meus exemplos, à minha irmã Mariane Benetti e à minha tia Denise A. Bovo, minhas maiores críticas e incentivadoras. Obrigada à todos pelo carinho e apoio, não só nessa, mas em todas as etapas da minha vida;

Ao Thiago C. de Angelis, meu melhor amigo e namorado. Agradeço por sua ajuda e apoio, que facilitaram imensamente a realização desse projeto, mas principalmente por sempre me questionar e motivar. O seu carinho e paciência foram essenciais.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Denise M. Zezell, principal responsável pela minha formação como profissional da ciência. Obrigada por todo o apoio e incentivo. Espero que ainda tenhamos longos anos de parceria pela frente;

Ao Dr. Alberto Blay e sua equipe, não só por terem possibilitado a realização de parte estudo, mas pela gentileza e presteza com a qual nos acolheram em sua clínica;

Ao Dr. Marco A. V. Alves, cuja competência e carisma facilitaram a realização deste estudo de forma inestimável;

À Profa. Luciana Correa, pelos conselhos na elaboração e execução deste projeto e pela ajuda e paciência nas análises histológica;

Ao Prof Sergei G. Kazarian, e a sua equipe Andrew Ewing, Dra. Kirsty Gibson, Dr. Anton Gabrienko, Dra. Satoko Tanimoto, Dra. Stefanie Glassford, Dr James Kimber e Dra Jennifer Dougan, pela gentileza com que me receberam em seu laboratório;

Ao Prof. Cid B. de Araújo, pela ajuda e atenção dispensados;

À Profa. Patrícia A. da Ana, pela paciência e alegria que com que sempre me socorreu ao longo desses anos de amizade;

Ao Dr. Moisés O. dos Santos, conselheiro de todas as horas, para todos os assuntos;

Ao MSc. Paulo Roberto Correa, amigo, instrumentista, motorista, carregador, tosador, entre inúmeras outras funções que desempenhou ao ajudar neste projeto;

À MSc. Maira F. de Andrade, cuja competência e dedicação como veterinária auxiliaram em muito na execução deste trabalho. E o carinho e apoio como amiga espero levar pras próximas etapas da minha vida;

À MSc. Letícia B. Sicchieri, companheira de experimentação animal e no desenvolvimento de produtos de suporte técnico. Obrigada por estar na hora certa, no lugar certo;

À Dra. Cláudia B. Zamataro, por sempre estar disposta a ajudar nos mais diferentes problemas enfrentados no decorrer deste trabalho;

Aos mais novos integrantes do Grupo de Biofotônica, Pedro A.A. de Castro e Derly A. Dias, por contribuírem nas etapas finais deste projeto;

Aos meus amigos Anne Latrive, Cassio A. Lima, José Quinto Jr., Marcelo N. Veloso, Thiago M. Pereira e Viviane P. Goulart, por tornaram a execução deste projeto mais suave e divertida. Poder contar com seus conselhos e opiniões foi um privilégio;

Ao Valdir Oliveira dos Santos, por todos os “quebra-galhos” durante esses anos de convivência;

Aos demais alunos do Centro de Lasers e Aplicações, pelas experiências, dificuldades, e vitórias compartilhadas;

À todos os pesquisadores do Centro de Lasers Aplicações, por contribuírem de diversas formas em várias etapas deste projeto;

Aos demais funcionários e técnicos do CLA, em especial ao Sr. Luiz Rosa, por realizarem seu serviço com excelência e principalmente bom humor;

Aos funcionários e membros da CPG do IPEN;

Ao Biotério do IPEN e seus funcionários, e também ao Biotério da Faculdade de Medicina da USP, pelos serviços prestados;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida (Processo 142485/2010-1);

À CAPES pela bolsa sanduíche concedida (Processo 211210/2013-7) ;

À FAPESP e ao CNPq por financiarem os projetos de pesquisa associados a esse trabalho: CEPOF-FAPESP (Proc.05/51689e 08/14270-8), MCT/CNPq (Proc.420177/2005-1), INFO/CNPq (Proc. 573.916/2008-0), CAPES (Proc. 211210/2013-7).

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos
pouco; à medida que vamos adquirindo
conhecimento, instala-se a dúvida.”*

Goethe

ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA POR ESPECTROSCOPIA ATR - FTIR APÓS REMOÇÃO DE FRAGMENTO DA REGIÃO MANDIBULAR COM LASER DE Er,Cr:YSGG OU UMA BROCA MULTILAMINADA

CAROLINA BENETTI

RESUMO

A reparação óssea é um fator crítico para o sucesso de procedimentos odontológicos e ortopédicos que necessitem do corte ósseo, sendo desejado que esta ocorra de forma rápida e eficaz. Uma maior compreensão da reparação óssea em um nível estrutural e molecular é o primeiro passo para o desenvolvimento de técnicas de corte e terapias regenerativas. Neste contexto, a técnica de FTIR possibilita obter informações sobre a estrutura e composição de tecido mineralizado. O principal objetivo deste projeto foi verificar a eficácia da espectroscopia FTIR na caracterização de diferentes estágios da reparação óssea após a realização de remoção óssea utilizando duas ferramentas de corte: o laser de Er,Cr:YSGG ou uma broca *carbide* multilaminada, em alta rotação. Foi realizada a remoção de dois fragmentos ósseos da mandíbula de 30 coelhos, e o processo de reparação óssea foi estudado imediatamente, 3, 7, 15, 21, e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Utilizou-se a técnica de espectroscopia FTIR para a aquisição das imagens espectrais dos diferentes estágios de reparação, e foi analisada a proporção entre os compostos do tecido utilizando as bandas de amidas, colágeno, carbonato e fosfato dos espectros de absorção. Também foi realizada a análise histológica dos mesmos estágios de reparação estudados. A técnica de espectroscopia FTIR se mostrou eficaz na caracterização do processo de reparação óssea. Observou-se uma tendência de aumento na proporção de compostos orgânicos até o Grupo 15D, após o qual houve aumento na proporção de compostos inorgânicos indicando maior mineralização após este período. Os resultados da análise histológica mostraram diferenças nos primeiros estágios de reparação entre o corte ósseo com o laser de Er,Cr:YSGG e a broca em alta rotação. Essas diferenças não foram detectadas na espectroscopia FTIR com as técnicas de análise utilizadas. Ainda assim, os resultados obtidos mostraram que a técnica de espectroscopia FTIR foi sensível às alterações de conteúdo orgânico no processo de reparação do tecido ósseo, podendo auxiliar com o desenvolvimento de novas técnicas e ferramentas para melhorar a eficiência deste processo.

**STUDY OF BONE REPAIR BY ATR - FTIR SPECTROSCOPY TECHNIQUE
AFTER THE REMOVAL OF A FRAGMENT FROM JAW REGION USING
Er,Cr:YSGG LASER OR DRILL**

CAROLINA BENETTI

ABSTRACT

Bone repair is a critical factor for the success of surgical procedures that require bone cut, and it is desired that it takes place quickly and effectively. The first step for the development of cutting techniques and regenerative therapies is a better understanding of bone repair in structural and molecular level. In this context, the FTIR technique allows one to obtain different information about the structure and composition of mineralized tissue. The main purpose of this project was to verify the effectiveness of FTIR spectroscopy in the characterization of different stages of bone healing process after the removal of a bone piece using two cutting tools: the Er,Cr:YSGG laser or a multilayered *carbide* bur at high rpm. Two jaw bone fragments were removed from 30 rabbits, and the process of bone repair was studied immediately, 3, 7, 15, 21, and 28 days after the surgery. The FTIR spectroscopy technique was used to acquire the spectral images of different stages of bone healing process, and the ratio of the bone compounds was analyzed using the bands of amide, collagen, carbonate and phosphate of the absorption spectra. Histological analysis was also performed to study the stages of bone repair. The FTIR technique was effective in characterizing the healing process. There was a trend between the proportions of organic and inorganic compounds that were comparable to the one observed in the histological analysis, showing that the FTIR technique is sensitive to changes that occur during the formation of new bone tissue. The results of the histological analysis showed differences in the early stages of bone repair between the cut with the Er,Cr:YSGG laser and the drill. These differences were not detected in FTIR spectroscopy with the used technique. Still, the results show that the FTIR technique is sensitive to changes in the organic content of bone tissue repair process, and it could corroborate to the development of new techniques and tools that improves the efficiency of this process.

Keywords: bone repair, FTIR, bone laser cut, histological analysis.

Sumário

1.	Introdução	10
2.	Objetivos	12
3.	Revisão da Literatura	13
3.1.	Tecido Ósseo	13
3.2.	Reparação Óssea.....	14
3.3.	Uso no Laser no Corte Ósseo	16
3.4.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	19
3.5.	FTIR em tecidos mineralizado	23
4.	Material e Métodos	28
4.1.	Modelo Animal Utilizado	28
4.2.	Delineamento Experimental.....	28
4.3.	Laser Er,Cr:YSGG	30
4.4.	Procedimento Cirúrgico	30
4.5.	Análise Histológica	33
4.6.	Análise Espectroscópica.....	34
4.6.1.	Preparação das amostras	34
4.6.2.	Aquisição das Imagens Espectrais	34
4.6.3.	Processamento das Imagens Espectrais	37
4.6.4.	Área da Rotina $\times$ Área com a Posição da Banda Fixa	41
4.6.5.	Correlação Intensidade $\times$ Razão das Áreas das Bandas.....	42
4.6.6.	Proporção entre as Áreas das Bandas.....	42
4.6.7.	Largura da Banda do Fosfato	43
5.	Resultados e Discussão	45
5.1.	Procedimento Cirúrgico	45
5.2.	Considerações sobre o Processo de Reparação Ósseo	46

5.3. Análise Histológica	47
5.4. Análise Espectroscópica.....	56
5.4.1. Aquisição das Imagens.....	57
5.4.2. Bandas Analisadas	58
5.4.3. Imagens espectrais	59
5.4.4. Considerações sobre a rotina desenvolvida.....	62
5.4.5. Correlação Intensidade $\times$ Razão das Áreas das Bandas.....	64
5.4.6. Área da Rotina $\times$ Área com a Posição da Banda Fixa	65
5.4.7. Razão entre as Áreas das Bandas: Instrumentos de Corte	66
5.4.8. Razão entre as Áreas das Bandas: Estágios de Reparação.....	71
5.4.9. Largura da Banda do Fosfato	75
5.5. Considerações Finais.....	77
6. Conclusão.....	79
7. Referências Bibliográficas	80
ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um fator crítico para o sucesso de procedimentos odontológicos e ortopédicos que necessitam do corte ósseo, sendo desejado que esta ocorra de forma rápida e eficaz. Os instrumentos de corte comumente utilizados são, em geral, mecânicos e promovem alta taxa de perda de material e vibração tecidual significativa, são potenciais causadores de contaminação e não proporcionam uniformidade à superfície de corte¹. Para que sejam alcançadas as condições ideais de formação de novos ossos para substituir ou restaurar funções traumatizadas, danificada ou perdidas, vários estudos vem sendo realizados *in vitro* ou *in vivo*, na expectativa de se encontrar uma ferramenta ou técnica mais eficientes no corte de tecidos mineralizados, em substituição à técnica de corte mecânico²⁻⁶.

Desde os anos 60, quando ocorreram as primeiras aplicações do laser na Medicina e Odontologia, foram realizados diversos estudos sobre a desempenho deste equipamento no corte ósseo⁷⁻¹⁰. Os lasers emissores na região do infravermelho (Er:YAG e Er,Cr:YSGG) se destacaram por serem fortemente absorvidos pela hidroxiapatita e água¹¹⁻¹⁵. Estes lasers já comprovaram ser eficazes ao promover o corte de tecidos mineralizados, apresentando vantagens em relação à precisão e espessura do corte, bem como pelo seu efeito hemostático¹⁶⁻¹⁸. Entretanto, ainda não há um consenso na literatura sobre a eficiência dos lasers em relação aos instrumentos cortantes normalmente utilizados, principalmente em relação aos estágios iniciais da cicatrização^{17,19-22}.

O processo da reparação óssea já foi bastante estudado do ponto de vista morfológico^{6,23,24}, entretanto, ainda são poucos os trabalhos que estudaram o processo regenerativo sob aspectos físico-químico, o que pode ser essa uma informação importante para determinar a eficiência do laser no corte ósseo.

Desta forma, o uso da técnica de espectroscopia FTIR (*Fourier Transform Infrared*) para a análise de amostras biológicas é uma área de pesquisa em expansão, que possibilita o estudo da composição molecular de uma amostra e a proporção de seus compostos de forma rápida e não destrutiva²⁵. Atualmente, as aplicações da técnica são vastas, além de ser utilizada na avaliação das propriedades químicas de matérias e processos biológicos²⁶⁻²⁹, no diagnóstico e caracterização de diversas patologias³⁰⁻³², a técnica de espectroscopia FTIR também é empregada na melhoria do processo de fabricação de medicamentos e alimentos³³⁻³⁵.

No estudo de tecidos mineralizados, a espectroscopia no infravermelho vem sendo utilizada para avaliar a estrutura molecular de ossos, esmalte e dentina³⁶⁻³⁸. Especificamente no caso do tecido ósseo, a espectroscopia no infravermelho possibilita obter informações sobre seu conteúdo mineral, cristalinidade e maturidade do colágeno, entre outras informações importantes para a manutenção das funções deste tecido³⁹. Além disso, muitas das características do espectro infravermelho estão associadas à idade e à maturidade do tecido³⁹, e podem ser utilizadas para estudar o processo de reparação óssea e doenças como osteoporose⁴⁰.

Uma maior compreensão da reparação óssea a nível estrutural e molecular, é o primeiro passo para o desenvolvimento de novas ferramentas e terapias regenerativas⁴¹. Neste contexto, a técnica de espectroscopia FTIR na caracterização de diferentes estágios do processo de reparação óssea é uma ferramenta potencial para fornecer novas informações sobre as mudanças estruturais e moleculares deste tecido, e contribuir com o desenvolvimento de novas técnicas para melhorar a eficiência deste processo.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto foi verificar a eficácia da espectroscopia FTIR na caracterização de diferentes estágios da reparação óssea, após a remoção de um fragmento da região mandibular utilizando duas ferramentas: o laser de Er,Cr:YSGG ou uma broca multilaminada.

Os objetivos específicos foram:

- desenvolver metodologia de aquisição dos espectros no equipamento utilizado, bem como o desenvolver uma metodologia para a análise dos espectros obtidos.
- realizar a análise histológica das amostras, obtendo-se assim uma caracterização morfológica comparativa do processo de reparação ósseo, para um melhor entendimento dos efeitos dos instrumentos de corte nos diferentes estágios de reparação óssea.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, que exerce funções de sustentação e proteção, além de ser também um reservatório de íons de cálcio e fosfato. Como todo tecido conjuntivo, ele é formado por células e uma matriz extracelular, sendo que no tecido ósseo a matriz extracelular é mineralizada, contendo sais de cálcio e fosfato.⁴²

A matriz óssea é constituída por 35% de compostos orgânicos e 65% de compostos inorgânicos. A parte orgânica é composta principalmente por fibras de colágeno tipo I (cerca de 90%) que, junto com a hidroxiapatita carbonatada ($Ca_5(PO_4,CO_3)_3(OH)+carbono$) e a água, formam os principais componentes do tecido ósseo.⁴³

A hidroxiapatita presente no tecido ósseo é pouco cristalina, em virtude das substituições iônicas que ocorrem em sua estrutura. Essas substituições podem provocar mudanças no parâmetro de rede dos cristais de apatita, que alteram sua cristalinidade e solubilidade⁴⁴. Entre as substituições iônicas possíveis, destacam-se as dos íon de fosfato (PO_4^{3-}) por íons de carbonato (CO_3^{2-}), e as dos íons do grupo hidroxila (OH^-) pelos íons de fluoreto (F^-) e carbonato (CO_3^{2-}). As substituições de íons na parte mineral do osso são de grande interesse biomédico, pois estão fortemente relacionadas com a osteoporose e outras doenças metabólicas⁴⁵.

Do ponto de vista macroscópico, o osso é dividido entre compacto/cortical e esponjoso/trabecular. O primeiro tipo parece uma massa sólida, enquanto os ossos esponjosos, como o da mandíbula, consistem de uma rede de espículas ósseas ou trabéculas que delimitam o espaço ocupado pela medula óssea.⁴²

Microscopicamente, o tecido ósseo diferencia-se quanto à organização das fibras colágenas. No osso lamelar, há alinhamento regular das fibras, enquanto no osso não lamelar as fibras colágenas encontram-se desorganizadas, sendo por isso um osso mais frágil. O osso não lamelar é produzido durante o reparo de uma fratura óssea, sendo uma característica de um osso ainda em desenvolvimento (imaturo).⁴²

O osso em crescimento ativo possui duas linhagens de células: a osteoblástica e a osteoclástica. A linhagem de células osteoblásticas inclui as células osteoprogenitoras e

seus derivados: os osteoblastos e osteócitos⁴². A linhagem de células osteoclásticas deriva de uma linhagem monócito-macrófago na medula óssea.⁴²

As células osteoprogenitoras são de origem mesenquimal e possuem potencial para proliferação e capacidade de diferenciação. Na vida pós-natal, elas persistem como células de revestimento, e são reativadas no adulto durante o reparo de fraturas ósseas. As células osteoprogenitoras dão origem aos osteoblastos que, por sua vez, se diferenciam em osteócitos após serem aprisionados dentro de lacunas na interior da matriz óssea.⁴²

Os osteoblastos são os responsáveis por depositar a matriz orgânica não mineralizada do osso (osteóide) ao longo da interface osteoblasto/osso, sendo seus principais produtos proteicos o colágeno tipo I e algumas proteínas não colagênicas. São também os osteoblastos que iniciam e controlam o processo de mineralização do osteóide.⁴²

Quando a formação óssea está completa, os osteoblastos se transformam em osteócitos, células ramificadas que ficam entre as lamelas do tecido⁴², responsáveis pela difusão de nutrientes para a matriz óssea.

Os osteoclastos derivam essencialmente de células monocíticas. Eles possuem um papel essencial no remodelamento e na renovação óssea.⁴²

3.2.Reparação Óssea

O processo de reparação de fraturas no tecido ósseo é influenciado por uma variedade de mecanismos patológicos, hormonais, biomecânicos e celulares⁴⁶. Ele segue uma sequência temporal e espacial que pode ser comparado com o desenvolvimento do osso na fase embrionária⁴⁷. Na formação embrionária, o tecido ósseo se desenvolve por meio da substituição de tecido conjuntivo pré-existente. Existem dois processos de formação óssea: a ossificação endocondral e a ossificação intramembranosa, que se diferenciam principalmente quanto ao tecido conjuntivo que origina o osso. Na ossificação endocondral o osso se origina de uma cartilagem hialina pré-existente, enquanto na ossificação intramembranosa o osso é formado diretamente do tecido conjuntivo primário ou mesênquima, sendo esse último o processo que ocorre no corpo.⁴²

A Figura 1 apresenta as fases do processo de reparação do tecido ósseo trabecular. Usualmente, o processo de reparação óssea é dividido em três fases: a fase inflamatória, a

fase de reparação e a fase de remodelação. Estas fases se diferenciam quanto as suas características celulares e os componentes da matriz extracelular, podendo se sobrepor umas às outras^{41,46}. Alguns autores dividem o processo de reparação óssea em quatro fases, pois consideram a formação do tecido de granulação uma fase independente da fase inflamatória^{47,48}.

Reparação em tecido ósseo trabecular

Figura 1 – Fases do processo de reparação óssea em tecido ósseo trabecular.⁴⁷

Na fase inflamatória, ocorre uma resposta do sistema imune à fratura: um hematoma se desenvolve no local e fibroblastos e células inflamatórias se infiltram no osso. Há um recrutamento de células mesenquimais, que se transformam em um tecido conjuntivo altamente vascularizado, chamado de tecido de granulação⁴⁶.

Na fase de reparação, ocorre a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, e esses começam a secretar a matriz óssea⁴⁶. Centros de ossificações se formam e se fundem, formando uma rede de trabéculas anastomosadas (como uma esponja). Nas trabéculas recém-formadas, as fibras colágenas possuem uma orientação aleatória⁴².

Por fim, na fase de remodelamento, ocorre a conversão do tecido ósseo entrelaçado em tecido lamelar, e também a condensação das camadas de tecido conjuntivo na parte externa e interna do osso^{42,46}. O processo é semelhante o remodelamento natural do tecido ósseo (Figura 2), entretanto com uma atividade celular bem mais intensa.

Figura 2 - Remodelação óssea de ossos trabeculados (imagem adaptada).⁴²

No processo de remodelamento natural do osso (Figura 2), os osteoclastos criam um espaço de reabsorção óssea na superfície do osso (nos ossos trabeculares). A interface entre o espaço de reabsorção e o osso trabecular é chamado de linha cimentante. Quando os osteoclastos param de remover o tecido, os osteoblastos entram em ação, revestem a linha cimentante e secretam o osteoide até que o novo tecido ósseo feche o espaço de reabsorção⁴².

3.3. Uso no Laser no Corte Ósseo

O uso de equipamentos lasers em aplicações clínicas já faz parte da rotina de muitas especialidades médicas, principalmente na dermatologia⁴⁹⁻⁵¹ e na oftalmologia^{52,53}. Na odontologia, o uso do laser na prática clínica vem crescendo ao longo dos anos graças à variedade de funções que os lasers podem desempenhar no consultório, como auxiliar na detecção e prevenção de caries⁵⁴⁻⁵⁶, e também no preparo e cirurgia de tecidos moles e duros⁵⁷.

Desde as primeiras aplicações do laser na odontologia, foram realizados diversos estudos sobre o desempenho deste equipamento no corte ósseo¹². Geralmente, o corte ou perfuração óssea é realizada com ferramentas mecânicas, tais como serras de corte ou brocas em rotação, que promovem alta taxa de perda de material e significativa vibração

tecidual, além de não proporcionarem uniformidade na superfície de corte, e serem potenciais causadores de contaminação, devido ao contato direto com o tecido.¹

Visando encontrar uma ferramenta de corte mais eficaz, foram testados diversos tipos de lasers¹², entretanto eles causavam grande dano térmico ao tecido ósseo, o que atrasava consideravelmente o seu processo de reparação^{6,7,58}. Com o avanço da tecnologia, novos equipamentos foram desenvolvidos e resultados favoráveis, utilizando o laser no corte ósseo, foram reportados⁵⁹. Entre eles, os lasers no infravermelho que demonstraram maior eficiência¹¹⁻¹⁴

Os lasers emissores na região do infravermelho, como o Er:YAG (2,94 μm) e Er,Cr:YSGG (2,78 μm), possuem comprimentos de onda fortemente absorvidos pela hidroxiapatita e água, dois dos principais componentes dos tecidos mineralizados¹⁵. Por sua forte absorção, o efeito desses lasers no tecido é restrito, e não promove danos ao tecido adjacente à região irradiada^{12,17,60}.

O gráfico do coeficiente de absorção da água e da hidroxiapatita para diferentes comprimentos de onda é apresentado na Figura 3, com o comprimento de onda de emissão do laser de Er,Cr:YSGG e Er:YAG em destaque. O coeficiente de absorção indica quanto da radiação eletromagnética é absorvida para um dado comprimento de onda. Verifica-se que o comprimento de onda de ambos os lasers coincidem com os picos de absorção da água e hidroxiapatita.

Figura 3 – Coeficiente de absorção da água e hidroxiapatita, com o comprimento de onda de emissão do laser de Er,Cr:YSGG (linha cheia) e Er:YAG (linha tracejada) em destaque.⁶¹

O corte dos tecidos mineralizados com os lasers no infravermelho ocorre pelo processo de ablação térmica ou ablação laser explosiva, ilustrado na Figura 4. Neste processo, a energia da radiação laser é absorvida pelas moléculas de água no tecido, que sofrem um aumento de temperatura e causam o aumento da pressão interna. Uma micro explosão ocorre, causando a remoção de material e a difusão do calor, o que resultará em uma cratera de ablação com pouco dano térmico ao tecido remanescente.

Figura 4 – Ilustração do processo de ablação laser explosiva.

Entre as principais vantagens do laser em relação aos instrumentos de corte usuais destaca-se o pequeno diâmetro do feixe, que possibilita uma corte mais fino e preciso ⁶². Adicionalmente, por não ser uma ferramenta de contato, o laser reduz as chances de contaminação²⁴ e causa menor vibração e trauma mecânico ¹⁶. Por fim, destaca-se também que os lasers no infravermelho promovem efeito hemostático, e também são capazes de cortar tecido mole ¹⁷.

Apesar das vantagens que os lasers no infravermelho apresentam na cirurgia, não há consenso na literatura sobre os efeitos do laser no processo de reparação óssea. Muitos trabalhos relataram um atraso nos primeiros estágios do processo de reparação óssea após o corte com os lasers de Er,Cr:YSGG ou Er:YAG em comparação ao observado com instrumentos cortantes usuais^{17,19-22}, sendo essa diferença atribuída à pequena zona de necrose causada pela ablação laser na interface de corte^{3,12,14,17}. Entretanto, há estudos que não observam diferenças entre os equipamentos de corte^{5,58,63}, e também há trabalhos que relatam um processo de reparação ósseo mais rápido após o uso dos lasers no infravermelho para a realização do corte ósseo^{14,60}.

As discrepâncias nos resultados relatados na literatura são atribuídas às diferenças existentes entre os trabalhos, como quanto ao laser utilizado (Er:YAG ou Er,Cr:YSGG), ao

uso ou não de água na irrigação das amostras, às diferenças de densidade de energia e taxa de repetição do laser, ao modelo animal, e à região de corte ^{3,5,14}. Desta forma, é evidente a necessidade de mais estudos para uma melhor compreensão dos efeitos do uso do laser no processo de reparação óssea ¹².

3.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Chama-se de espectroscopia as técnicas de análise que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria na obtenção de informações físicas e químicas sobre o material analisado. Na espectroscopia no infravermelho, como nome sugere, utiliza-se a região no infravermelho do espectro eletromagnético, que corresponde aos comprimentos de onda (λ) de 0,78 μm a 1000 μm ⁶⁴ (Figura 5).

Figura 5 – Espectro de ondas eletromagnéticas (adaptado da imagem original). ⁶⁵

A radiação infravermelha é não ionizante e de baixa energia, portanto não promove transições eletrônicas no material. Por conveniência, nas análises espectroscópicas na região do infravermelho, a grandeza utilizada para representar a radiação é o número de onda, representado por:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

onde $\bar{\nu}$ corresponde ao número de onda e λ ao comprimento de onda. O número de onda é proporcional à energia e frequência da onda eletromagnética, sendo normalmente apresentado na unidade de cm^{-1} . ^{64,66}

A técnica de espectroscopia de infravermelho baseia-se na absorção da radiação eletromagnética pelo material. As moléculas de um material estão em constante movimento, e possuem uma frequência natural de vibração. Quando a movimentação dos átomos da molécula causa uma variação na distribuição de cargas molecular (mudança no momento dipolo), um campo elétrico local é criado. Se a radiação incidente no material possui a mesma frequência do campo elétrico gerado, estas interagem e a radiação incidente é absorvida. Portanto, duas condições são necessárias para que ocorra a absorção: i) a molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo e; ii) a radiação incidente deve ter a mesma frequência de vibração da molécula. Desta forma, conhecendo a frequência da radiação absorvida, é possível identificar a molécula responsável pela absorção ⁶⁴.

Em número de onda, a região do infravermelho corresponde à região espectral de 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , sendo a sub-região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) a mais comum nas análises espectrais, principalmente a faixa de 4.000 cm^{-1} a 670 cm^{-1} , devido à grande quantidade de modos vibracionais associados a elementos orgânicos que absorvem a radiação eletromagnética nesta região ⁶⁴.

Atualmente, os equipamentos mais utilizados para análises por espectroscopia no infravermelho são os espectrofotômetros com Transformada de Fourier, cujo funcionamento se baseia no princípio do interferômetro de Michelson ⁶⁶. Neste, um feixe de radiação passa por um *beamsplitter* (um espelho semi-reflexivo) e é dividido em duas partes, parte do feixe é refletida por um espelho fixo e a outra parte é refletida por um espelho móvel. Quando as partes voltam a se recombinar, há uma diferença entre os caminhos ópticos percorridos, que pode gerar uma diferença de fase entre as ondas eletromagnéticas. Dependendo desta diferença, a interação entre as parcelas do feixe pode ser construtiva ou destrutiva.

A Figura 6 ilustra o funcionamento dos espectrofotômetros com Transformada de Fourier. Neles, a radiação emitida por uma fonte de radiação infravermelha passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector, e é gerado um gráfico da intensidade em função do deslocamento do espelho móvel, chamado de interferograma. A transformada de Fourier é utilizada, e o interferograma é transformado em um gráfico que representa a quantidade de radiação detectada em função da frequência da radiação, chamado de espectro ⁶⁴.

Figura 6 – Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR

Os equipamentos de espectroscopia de infravermelho a aquisição dos espectros por transmissão, reflexão, reflexão total atenuada e reflexão difusa, além das técnicas associadas à microscopia. Dentre essas, a técnica por Reflexão Total Atenuada (ATR) é bastante utilizada por requerer pouco ou nenhum preparo de amostras⁶⁶.

Basicamente, a técnica de ATR consiste na reflexão de um feixe que incide em um ângulo crítico que passa de um meio mais denso (um cristal) para um meio menos denso (amostra). Nesta condição, uma pequena parcela da radiação incidente (chamada onda evanescente) penetra poucos micrometros no meio (amostra), podendo ser absorvida. Quando ocorre absorção, o feixe sofre uma atenuação, sendo possível identificar as bandas de absorção da amostra e, conseqüentemente, os seus compostos. O esquema de funcionamento do acessório ATR é representado na Figura 7. O meio onde o feixe se propaga inicialmente é composto por um material de alto índice de refração, normalmente um cristal de diamante, seleneto de zinco (ZnSe) ou germânio (Ge)^{64,67}. A proporção de

feixe refletido varia com o ângulo de incidência, havendo um ângulo crítico onde a reflexão é total, dependendo do cristal utilizado como elemento de reflexão ⁶⁶.

Figura 7 – Esquema de funcionamento do acessório ATR

A profundidade de penetração da radiação na amostra depende do comprimento de onda da radiação, do ângulo de incidência desta com a amostra, e dos índices de refração do cristal do equipamento e do material analisado ⁶⁶. Por exemplo, a profundidade de penetração da radiação na faixa do infravermelho médio no tecido ósseo varia de 0,5 μm a 5 μm , aproximadamente ⁶⁸.

Nos equipamentos ATR-FTIR convencionais, um detector de elemento único é utilizado, e apenas um espectro é obtido em cada medida, representando o espectro médio da região irradiada. Na aquisição de imagens espectrais com o ATR-FTIR, um detector FPA (*focal plane array*) permite a aquisição simultânea de espectros de uma área da amostra. Ao final da análise, obtém-se uma imagem espectral, em que cada pixel da imagem representa um espectro da região correspondente da amostra, e não apenas o espectro médio (Figura 8). O desenvolvimento desta técnica possibilitou analisar uma região específica da amostra de forma simples e rápida ⁶⁹.

Figura 8 – Esquema de funcionamento do detector FPA

3.5. FTIR em tecidos mineralizado

O uso da espectroscopia FTIR na análise dos tecidos mineralizados do corpo humano, como os ossos, cartilagem, dentina e esmalte, já é bem estabelecido. Diversos estudos já foram realizados neste tema, utilizando a técnica para análises quantitativas da composição e cristalinidade dos tecidos, bem como estudos qualitativos sobre a natureza das fases minerais e alterações da composição mineral e da matriz orgânica no processo de mineralização.^{70,71}

Os tecidos mineralizados são formados, principalmente, por hidroxiapatita e colágeno, com exceção do esmalte dental cuja matriz orgânica é composta de enamulina e amelogenina⁷⁰. Devido à semelhança composicional, esses tecidos apresentam praticamente as mesmas bandas de absorção no espectro do infravermelho, conforme pode ser observado na Tabela 1 ao final da seção. Os principais compostos identificados são: os modos de vibração do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$) e ν_4 (604 cm^{-1}), os modos de vibração do carbonato ν_4 (875 cm^{-1}) e ν_2 ($1560\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$), a banda de absorção da amida I ($1680\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1580\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$), amida III ($1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) e colágeno (1335 cm^{-1} , 1283 cm^{-1} , 1203 cm^{-1}). A Figura 9 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho do tecido ósseo.

Figura 9 - Espectro de absorção na região do infravermelho do tecido ósseo.

Um dos principais aspectos avaliados com a técnica de espectroscopia FTIR em tecido mineralizados é a proporção entre os compostos da matriz orgânica e o conteúdo

mineral, chamada de razão matriz/mineral. Ela é obtida calculando-se a razão entre a área da banda da amida I ($1595\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$) e a área da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$). A relação dessa proporção com o conteúdo matriz orgânica e o conteúdo mineral do tecido ósseo teve eficácia comprovada pela correlação com resultados de análises gravimétricas⁷²⁻⁷⁴.

Outra característica dos tecidos mineralizados que pode ser avaliada com a análise espectroscópica é o conteúdo relativo de carbonato, que indica a extensão da incorporação de carbonato na estrutura de hidroxiapatita. Ele é calculado pela razão entre a área da banda de carbonato ν_2 ($840\text{--}890\text{ cm}^{-1}$) e a área da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$), sendo a relação entre essa proporção e o conteúdo de carbonato do tecido ósseo, demonstrada por comparação com análises gravimétricas^{39,70}.

Estudos sobre a denaturação do colágeno⁷⁵ mostraram que as sub-bandas da amida I localizadas em 1660 cm^{-1} e 1690 cm^{-1} , estão associadas à diferentes conformações desta proteína, sendo a razão de suas áreas ou intensidades relacionadas com a organização do colágeno nos tecidos mineralizados, que por sua vez está associada às propriedades mecânicas destes tecido^{39,76}.

A cristalinidade e maturidade dos tecidos mineralizados também estão associadas às características do espectro de absorção no infravermelho. A maturidade está relacionada à proporção de domínios de apatita e não apatita na estrutura do tecido, sendo o índice de maturidade dado pela proporção entre as subáreas da banda do fosfato localizadas em 1030 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} , associadas respectivamente ao estiramento assimétrico do fosfato ($\nu_3\text{PO}_4$)⁷⁷ e à apatita não-estequiométrica e pouco cristalina⁷⁸.

Por sua vez, a cristalinidade está relacionada à perfeição e tamanho dos cristais nos domínios da apatita. Comparações com resultados obtidos por difração de Raio-X demonstraram que a largura a meia altura da banda de fosfato localizada em 604 cm^{-1} é inversamente proporcional ao índice de cristalinidade (IC)⁷⁹. Ainda sim, é possível calcular o índice de cristalinidade utilizando a *Equação 2*⁸⁰:

$$CI = \frac{A_{604} + A_{564}}{A_{590}} \quad \text{Equação 2}$$

onde A_x corresponde à intensidade da absorbância do número de onda x . Estes dois métodos para o cálculo de cristalinidade foram comparados, e apresentaram uma boa correlação⁷⁹.

Ainda existe uma terceira característica do espectro de infravermelho que é associada à cristalinidade do tecido ósseo, dada pela razão entre a intensidade ou área das sub-bandas do fosfato localizadas em 1030 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} ^{74,81}. Entretanto, alguns autores afirmam que a proporção entre as sub-bandas $1030/1020\text{ cm}^{-1}$ corresponde à relação entre o fosfato de domínios de apatita sobre domínios de não apatita que, por conseguinte, está associada a um índice de maturidade mineral em vez de um índice de cristalinidade. Como durante o processo de amadurecimento do tecido ósseo ocorre uma diminuição dos domínios de não-apatita (decorrente do aumento dos domínios de apatita), e também do aumento do número e tamanho dos cristais dos domínios de apatita, tanto o índice de maturidade quanto o de cristalinidade aumentam com o amadurecimento do tecido ósseo, o que causa confusão sobre quais características do tecido ósseo estão realmente sendo avaliadas.⁷⁹

O espectro no infravermelho ainda pode ser utilizado para estimar o conteúdo de ácido fosfórico dos tecidos, dado pela proporção entre as sub-bandas de 1127 cm^{-1} e 1196 cm^{-1} , conforme verificado usando uma série de apatitas sintéticas de diferentes pH. A substituição de ácido fosfórico em tecido mineralizado pode alterar suas propriedades mecânicas e a sua resposta á tratamentos⁸².

Normalmente, as amostras são dissecadas para a análise espectroscópica para que a água não prejudique as análises espectrais³⁹, uma vez que os modos de vibração da água no espectro infravermelho são sobrepostos aos espectros das proteínas, sendo difícil determinar, com precisão qual, a contribuição de cada componente na banda visualizada^{83,84}. Entretanto, algumas informações sobre as modificações estruturais da amostra podem ser obtidas pelo estudo da banda da água^{84,85}

A presença de água desempenha um papel significativo nas propriedades dos tecidos mineralizados, como nos parâmetros cristalográficos, na cor, e em sua birrefringência, características importantes principalmente para os tecidos dentários⁸⁶. Portanto, a eliminação da água em tratamentos que envolvem aumento de temperatura pode comprometer as características do tecido. Estudos demonstraram que a razão entre as

áreas das bandas de água ($3793\text{--}2652\text{ cm}^{-1}$) e fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$) está relacionada à concentração de água na amostra⁸⁵.

De forma geral, as razões entre as áreas das bandas do espectro mostram proporções entre os compostos, e pode ser utilizada para uma análise semiquantitativa da amostra^{37,87,88}. Estudos que promoveram o aquecimento de amostras sugerem que as razões das áreas das bandas de Amida II, Amida III e colágeno em relação à área da banda do fosfato, estão relacionadas com a proporção de conteúdo orgânico do tecido^{84,87,88}. O comportamento observado para essas bandas é semelhante ao observado para a razão Amida I/Fosfato^{84,88}, utilizado para determinar a proporção matriz/mineral.

Essa semelhança observada é bastante positiva, uma vez que as bandas de Amida III e colágeno são pouco influenciadas pelos modos de vibração de outros componentes da tecido, como água e compostos da matriz mineral. Desta forma, o seu comportamento está diretamente relacionado à matriz orgânica dos tecidos mineralizados. Entretanto, por serem bandas de baixa intensidade, são necessários cuidados na aquisição e análises dos espectros, pois sua forma e posição são sensíveis à variações ou ruídos.

Tabela 1 – Bandas de absorção no espectro no infravermelho dos tecido mineralizados. ^{68,83}

Componentes	Esmalte	Dentina	Osso
H ₂ O adsorvida (estiramento assimétrico)	3448	3410	3450
H ₂ O ($\nu_1+2\nu_2$)	-	3200	3212
H ₂ O ou Amida A ($\nu_1+2\nu_2$)	-	3318	3300
OH Estrutural (estiramento)	3569	3580	-
Amida B	3066		3083
C-H (estiramento)	- - -	2961 2931 2875	2950 2853
Amida I C=O H ₂ O adsorvida (deformação assimétrica ν_2)	1634 1650 1638	1700-1550 1648	1642 1650 1680-1620 1680-1600
Carbonato + Amida II N-H C-N	1395 1443 1534	1393 1442 1540	1550/1553 1560-1510 1580-1480
Carbonato (estiramento assimétrico ν_3)	1415 1460 1480 1543	1410 1452 1509 1547 1540	1417/1409 1441/1445 1460 1476 1538
Colágeno	-	1338/1335 1288/1281 1204/1201	1334/1342/1335 1276/1283 1204/1203
Amida III	1236	1245/1234 1224	1320-1190 1300-1200 1238/1233 1240
Fosfato (estiramento assimétrico ν_3)	1028 1008	1280-950	1020/1003 1100 1110 1125 1145
Carbonato (shake)	-	1315	-
Carbonato (deformação assimétrica ν_2)	873/880	872	868/866 871/871 877/879
Fosfato (ν_1)	950-1000	470/467	960/957
OH Estrutural (libração)	635	749	676
Fosfato (deformação assimétrica ν_4)	561 602 582 620	563 603 755 606 559	600/595 560 575
Fosfato (deformação assimétrica ν_2)	471	471 470/467	470

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo Animal Utilizado

Visando que o estudo se aproximasse ao máximo da situação clínica e, considerando que o laser Er,Cr:YSGG utilizado neste trabalho foi desenvolvido para fins odontológicos, optou-se por estudar a reparação óssea na região mandibular. Desta forma, por seu tamanho e disponibilidade, e também pelas condições de alojamento e manutenção disponíveis, adotou-se o coelho como modelo animal.

O projeto obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEN (No. 108/12 – CEUA-IPEN), conforme documento apresentado no Anexo I. No total, foram utilizados 30 coelhos, machos, adultos, da raça New Zealand, pesando entre 3,0 e 4,0 Kg. Os coelhos foram adquiridos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares durante todo o período de experimentação.

4.2. Delineamento Experimental

A Figura 10 apresenta o delineamento da etapa experimental no desenvolvimento. Os coelhos foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a remoção de um retalho ósseo da região mandibular. Do lado esquerdo, o corte ósseo foi realizado com o laser de Er,Cr:YSGG, e do lado direito, com um instrumento rotatório padrão.

O armazenamento das amostras variou conforme a técnica de análise pretendida. As amostras destinadas às análises histológicas foram imersas em formol 10%, e as amostras separadas para as análises espectroscópica foram estocadas em ambiente úmido e refrigeradas.

De cada animal foram retiradas duas amostras da região da mandíbula: uma amostra onde o corte ósseo foi realizado com o laser de Er,Cr:YSGG (Grupo Laser) e uma amostra homóloga onde o corte ósseo foi realizado com a broca multilaminada (Grupo Broca). Foram definidos seis grupos experimentais com cinco animais cada um, que se diferenciavam quanto ao período decorrido desde o procedimento cirúrgico, conforme apresentado na Tabela 2. Decorrido o período definido de cada grupo, realizou-se a eutanásia dos animais e a região óssea de interesse foi removida e limpa.

Figura 10 – Delineamento experimental da etapa experimental planeja.

Tabela 2 – Grupos experimentais em relação ao período decorrido em relação ao o procedimento cirúrgico.

	Período decorrido desde o procedimento cirúrgico (dias)
Grupo 0D	0
Grupo 3D	3
Grupo 7D	5
Grupo 15D	15
Grupo 21D	21
Grupo 28D	28

4.3. Laser Er,Cr:YSGG

O laser de Er,Cr:YSGG (Waterlase®, Biolaser, USA), é um laser pulsado, emissor no infravermelho, desenvolvido para fins odontológicos. Sua peça de mão permite o uso de diversas pontas de safira, de diferentes comprimentos e diâmetro. O equipamento também possibilita o resfriamento da superfície irradiada com jatos de ar e água. Suas principais características são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros do equipamento laser (especificações do fabricante).

Classificação	Classe IV
Meio	Er,Cr:YSGG
Comprimento de Onda	2,78 μm
Modo	Pulsado
Taxa de repetição fixa	20 Hz
Potência Média	0.0 - 6.0 W
Energia do Pulso	0 - 300 mJ
Duração do Pulso	140 – 150 μs
Diâmetro das pontas de entrega	200 – 1200 μs
Divergência	8°

4.4. Procedimento Cirúrgico

Para a analgesia durante o procedimento cirúrgico, foi aplicada uma dose de 0,3 mg/kg Cloridrato de Tramadol, 30 minutos antes do início da cirurgia. A sedação dos animais foi realizada administrando-se 5 mg/kg de Xilazina associada à 35 mg/kg de Cetamina por via intramuscular, aproximadamente 10 minutos antes do início do procedimento.

A cirurgia foi realizada na região submandibular dos coelhos, conforme ilustrado na Figura 11. Foi feita a tricotomia ampla em ambos os lados da mandíbula, incluindo a borda inferior e o ramo ascendente. Também foi realizada a antisepsia da pele com

Digluconato de Clorexedina 2%. Em cada lado da mandíbula, foi realizada uma incisão intraoral na região periosteal de sulco vestibular, sendo exposta a tábua óssea cortical. Um fragmento de tecido ósseo de aproximadamente $7 \times 7 \times 3 \text{ mm}^3$ foi retirado, originando um defeito de 147 mm^3 no local. O corte ósseo foi realizado com o laser Er,Cr:YSGG do lado esquerdo da mandíbula e com a broca multilaminada do lado direito. Após a retirada do fragmento, foi realizada a sutura do tecido em planos com fio absorvível.

Figura 11 – Representação da região da mandíbula dos coelhos onde o retalho ósseo foi retirado, representado pelo quadrado cinza (imagem adaptada) ⁶³.

A densidade de energia do laser foi ajustada em 53 J/cm^2 , sendo a refrigeração das amostras realizadas com 80% de água e ar (Tabela 4). A ponta utilizada no equipamento foi a G6, com 0,6 mm de diâmetro e 4,0 mm de comprimento. A densidade de energia do laser foi medida utilizando um medidor de potência antes e depois de cada cirurgia. A densidade de energia utilizada foi determinada com base na literatura e a realização de estudos pilotos. A broca *carbide* multilaminada foi a FG 701, em alta rotação, ambas ilustradas na Figura 12.

Tabela 4– Parâmetros de irradiação utilizados no Laser de Er,Cr:YSGG

Ponta	G6
Diâmetro (mm)	0,6
Diâmetro útil (mm)	0,04
Comprimento (mm)	0,4
Densidade de Energia (J/cm^2)	53
Energia Média (mJ)	150
Potência Média (W)	2,75
Refrigeração água (%)	80
Refrigeração ar (%)	80

Figura 12 - (A) Ponta de safira G6 utilizada no laser de Er,Cr:YSGG; (B) broca multilaminada FG 701 utilizada no morto de alta rotação.

Após a cirurgia, os coelhos receberam 11.000 UI/Kg de Agrodel (Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, e Estreptomicida) uma vez ao dia, e 0,3 mg/kg Cloridrato de Tramadol de 12 em 12 horas, ambos por via intramuscular durante três dias.

A eutanásia dos animais foi realizada por método químico não inalante, tendo sido utilizado 105 mg/kg de Cetamina associada a 15 mg/kg de Xilazina por via intramuscular, seguidas de 0,1 ml de cloreto de potássio (KCl) 19% intracardíaco. Os períodos para a eutanásia foram: imediatamente após a cirurgia, e após 3, 7, 15, 21 e 28 dias do procedimento cirúrgico ¹⁷.

Após a eutanásia, a região do retalho ósseo foi separada com uma margem de segurança. As amostras foram limpas com água, e o tecido mole removido manualmente. A Tabela 5 apresenta a separação final das amostras por técnica de análise, lembrando que são obtidas duas amostras homólogas (uma de cada lado da mandíbula).

Tabela 5 – Total de amostras planejadas em cada técnica de análise nos seis grupos experimentais considerando o instrumento de corte utilizado.

	Análise Histológica (amostras)		Análise Espectroscópica (amostras)	
	Laser Er,Cr:YSGG	Broca Multilaminada	Laser Er,Cr:YSGG	Broca Multilaminada
Total de amostras em cada etapa do processo de reparação óssea	2	2	3	3

4.5. Análise Histológica

Para a análise histológica, as peças de osso contendo a região de interesse foram mantidas em formol 10% para a fixação do material. Posteriormente, as peças foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 4, 13%, pH 7,2) até atingir o ponto de corte.

Depois de desmineralizadas, as peças foram lavadas em PBS por 24 horas, e desidratadas em uma sequência crescente de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 95% e álcool absoluto). Foram realizadas duas passagens em cada concentração de álcool de 30% à 95%, e quatro passagens na concentração de álcool absoluto.

A diafanização das peças foi realizada em três banhos de Xilol de 45 minutos cada, aproximadamente. A parafinização das amostras foi realizada com três banhos em Paraplast de 1 hora cada em estufa à 60 °C. Ao final do processo, os blocos foram incluídos em Paraplast.

Para cada amostra, foram realizados cortes seriados de 5 µm, até que fosse possível verificar a região de interesse (região de defeito ósseo ou reparação óssea, dependendo do grupo experimental analisado). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e tricrômico de Masson para a análise morfológica.

Os campos de interesse de cada lâmina histológica foram digitalizadas no microscópio Leica DM2500 com uma câmera Leica DFC 295 acoplada (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. O programa de aquisição das imagens utilizado foi o LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

Avaliou-se as principais características dos cortes histológicos, comparando-os quanto ao instrumento de corte ósseo utilizado. Em cada campo definiu-se o aumento do microscópio de acordo com as estruturas observadas em cada grupo experimental.

4.6. Análise Espectroscópica

4.6.1. Preparação das amostras

Para as análises utilizando a técnica de espectroscopia ATR-FTIR, as peças de osso contendo a região de interesse foram polidas com lixas d'água de granulações crescentes (1200, 2500 e 4000), sendo também utilizada uma suspensão monocristalina de diamante (1 μm). Ao final do procedimento, as amostras possuíam aproximadamente 100 μm de espessura. Este procedimento foi realizado para facilitar o contato da amostra com o diamante, uma vez que a espessura da amostra não é um fator crítico na técnica de espectroscopia ATR-FTIR⁶⁹. Para minimizar a influência da água nos espectros de absorção no infravermelho³⁹, as amostras foram mantidas em um recipiente com sílica gel por 96 horas.

Para serem utilizadas como controle experimental, também foram preparadas amostras de osso mandibular íntegro. Portanto, foram sete grupos experimentais analisados por espectroscopia ATR-FTIR: os seis grupos relacionados com os períodos de reparação óssea e o grupo controle (um osso íntegro da mesma região).

4.6.2. Aquisição das Imagens Espectrais

A análise espectroscópica foi realizada com um espectrofotômetro FTIR (Varian 670 FT-IR), juntamente com o sistema ATR *Specac Imaging Goldengate TM*, e o detector FPA (*Focal Plane Array*) do sistema *Varian Large Samples*, como ilustrado na Figura 13. O software para a aquisição dos espectros foi o *Agilet resolution Pro* e para a análise das imagens, o *CytoSpec*. A região espectral avaliada foi de 3800 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras por espectro⁶⁸. O compartimento do detector foi resfriado com nitrogênio líquido, sendo 73 K, aproximadamente, a temperatura ideal para a realização das medidas.

Os detectores FPA permitem a aquisição de imagens espectrais, em que cada pixel da imagem corresponde ao espectro de uma pequena região da amostra. Desta forma, cada medida realizada resultou em uma imagem espectral de 64×64 pixels, que correspondiam a 780 μm de largura e 610 μm de altura, portanto cada pixel correspondente ao espectro de uma área de aproximadamente $12,2 \times 9,5\text{ }\mu\text{m}^2$ da amostra.

Figura 13 - (1) espectrofotômetro FTIR (Varian 670 FT-IR); (2) detector FPA do sistema *Varian Large Samples*, (C) *ATR Specac Imaging Goldengate TM*

Para representar as imagens espectrais era necessário selecionar um parâmetro dos espectros, que poderia ser desde o valor da intensidade de um comprimento de onda específico até a área de uma grande região do espectro. Selecionado o parâmetro, o programa construía a imagem espectral e utilizava uma escala de cor para representar o parâmetro escolhido (área/intensidade). Nestas imagens, os valores maiores são apresentados em vermelho, e os menores em azul, conforme a Figura 14.

Figura 14 – Escala de cor utilizada nas imagens espectrais

A cada medida, o software automaticamente subtraía da imagem espectral obtida uma imagem espectral do ambiente (background) previamente adquirida, para que eventuais alterações no ambiente não influenciassem nas medidas.

A Figura 15 mostra uma imagem do background (Figura 15A) e uma imagem de uma amostra de osso íntegro, sem a seleção de nenhum parâmetro específico para formar a escala de cor da imagem (Figura 15B). Verifica-se que as imagens são bastante parecidas, e formam uma imagem que se assemelha a uma ‘rosquinha’. Esse padrão é semelhante ao perfil do feixe de radiação utilizada nas medidas, cujo perfil de intensidade não era igualmente distribuído, e que possuía o perfil ‘rosquinha’. Desta forma, a imagem espectral inicialmente gerada pelo programa não pode ser utilizada para estudar a amostra, uma vez

que repete o padrão de intensidade do feixe e não uma característica da amostra, sendo essencial a seleção de um parâmetro do espectro para a redefinição da escala de cor.

Figura 15 – (A) imagem espectral do background; (B) imagem espectral de uma amostra de osso maduro sem a seleção de nenhum parâmetro específico para formar a escala de cor da imagem.

A formação da imagem utilizando parâmetros específicos do espectro pode ser entendido como um agrupamento por semelhança em relação à proporção do parâmetro utilizado. Dessa forma, é possível gerar uma série de imagens espectrais a partir de uma mesma medida, uma vez que diferentes parâmetros podem ser selecionados. A Figura 16, mostra três imagens espectrais construídas a partir da mesma medida.

Figura 16 –Imagens espectrais construídas a partir da mesma medida, em (A) o parâmetro selecionado para a formação da imagem foi a área da banda do fosfato; em (B) foi a área da banda da Amida I e em (C) a razão entre as área das duas bandas

Na Figura 16 é interessante notar que entre as três imagens, a imagem espectral formada pela razão das área das bandas de Amida I/Fosfato (Figura 16C) foi a mais homogênea. Isso ocorreu porque a proporção entre as áreas compensam eventuais diferenças de intensidade na aquisição dos espectros que formam a imagem.

O contato entre a amostra e o cristal de diamante é um fator determinante na qualidade dos espectros, existindo um suporte para pressionar a amostra ao cristal do acessório ATR. Visando aprimorar o contato amostra-cristal, substituiu-se a peça de safira normalmente utilizada no suporte por uma peça metálica, ambas representadas na Figura 17. A utilização da ponta metálica possibilitou utilizarmos uma ferramenta de torque para aumentar e padronizar a pressão sobre a amostra, aumentando assim o contato da amostra com o cristal do ATR. O torque utilizado foi de 120 cNm. O teste foi realizado em uma amostra de osso integro, e a combinação peça-suporte que apresentou a imagem espectral com melhor qualidade foi utilizada nas medidas das amostras de osso.

Figura 17 – Peça de safira (A) e peça de metal (B) utilizadas para pressionar a amostra ao cristal do acessório ATR.

4.6.3. Processamento das Imagens Espectrais

O primeiro passo para a análise das imagens espectrais foi a seleção da área de interesse, uma vez que nem todas as amostras cobriam totalmente o cristal do acessório ATR. Para a seleção da região de interesse, a imagem espectral foi construída utilizando a intensidade da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$), por essa ser uma banda intensa e bem definida. A região de interesse da imagem espectral foi selecionada, e as demais regiões foram subtraídas da imagem, conforme ilustrado na Figura 18.

A escolha do parâmetro do espectro utilizado para formar a imagem pode alterá-la completamente. Entretanto esse não é o único parâmetro que pode afetar completamente a imagem, sendo que o valor de máximo e mínimo da escala de cor também desempenham um papel importante.

Figura 18 - (A) imagem completa; (B) seleção da região de interesse; (C) Imagem final.

Ao gerar a imagem espectral, o programa define os valores de máximos e mínimos utilizados na escala de cor da imagem espectral de forma a melhor representar a distribuição dos valores do parâmetro escolhido. Entretanto, é possível alterar a escala da imagens manualmente, definindo novos valores de máximo e mínimo, o que pode alterar completamente a imagem gerada. Por exemplo, a Figura 19 apresenta a mesma imagem espectral, formada utilizando o mesmo parâmetro do espectro para formar a escala de cor. A única diferença entre as figuras é que a Figura 19A foi gerada pela escala automática do programa, enquanto que na Figura 19B a escala foi modificada para que o padrão de cor observado represente a ausência ou presença de osso.

Alterar manualmente a escala de cor utilizada nas imagens espectrais possibilita padronizar o valor da escala em todas as imagens. Entretanto, o padrão utilizado para formar a imagem espectral está associado à intensidade do espectro, que varia de uma medida para outra, e portanto, mesmo que a mesma escala de cor seja utilizada em duas medidas diferentes, não significa que as características dos espectros que formam a imagem estejam representados da mesma forma. Por essa razão, as imagens espectrais foram sempre comparadas utilizando a escala automática do programa.

Há diversos parâmetros do espectro do infravermelho que podem ser utilizados na tentativa de analisar os diferentes estágios reparação do tecido ósseo^{79,89}, sendo a proporção entre as áreas das bandas bastante usual nas análises de tecido mineralizados^{36,84,87,90}, por ser um método relativamente simples, que fornece uma análise semiquantitativa da proporção entre os compostos orgânicos e inorgânicos.

Figura 19 – Imagem espectral com escala automática e escala alterada para mostrar a ausência e presença de tecido ósseo.

No espectro infravermelho do tecido ósseo ocorrem sobreposição de diferentes modos de vibração de um mesmo componente, e também a sobreposição de bandas associadas a diferentes compostos, como na região de 1550 cm^{-1} à 1250 cm^{-1} , onde se encontram bandas associadas ao colágeno e ao carbonato. A sobreposição de bandas dificulta a análise espectral, uma vez que não existe um método para determinar com exatidão qual proporção corresponde a cada componente. Os métodos normalmente utilizados fazem aproximações com Gaussiana ou Lorentziana para representar as sub-bandas, mas ainda assim não são métodos precisos, uma vez que o ajuste necessita que o usuário forneça informações sobre as bandas analisadas.

Um método bem aceito para o cálculo das áreas de bandas sobreposta é traçar uma linha reta na parte da banda que se sobressai à sobreposição (*baseline*), e descartar a parte da banda que é comum a mais de um componente, como ilustrado na Figura 20. Desta forma, garante-se que a área analisada é apenas do componente de interesse. Na utilização deste método apenas as bandas que se sobressaem na sobreposição podem ser analisadas.

As bandas analisadas neste experimento foram: amida I, amida II, carbonato, amida III, colágeno, e fosfato. No *CytoSpec* o cálculo da área da banda é realizado automaticamente em todos os espectros da imagem após o usuário fornecer ao programa a posição inicial e final da banda, sendo possível construir imagens utilizando a razão entre a área de duas bandas como parâmetro da escala de cores da imagem. Entretanto, ao utilizar o mesmo valor de posição inicial e final na banda do 4096 espectros que forma a imagem espectral, o programa não leva em considerações as diferenças existentes entre os espectros, o que pode levar a erros no cálculo de área, como o apresentado na Figura 21, no cálculo de área para a banda da Amida III.

Figura 20 – *Baseline* para o cálculo da área da banda

Figura 21 – Falha no cálculo automático sob a área da banda da Amida III (extraído do programa *Agilet resolution Pro* utilizado na aquisição dos dados).

Problemas no cálculo de área como o apresentado na Figura 21 resultam em áreas menores que as reais, ou até mesmo em valores negativos, o que interfere diretamente nas análises do espectro.

Para que as falhas observadas no cálculo de área pelo *CytoSpec* não influenciassem nos resultados do estudo, uma rotina para a análise de espectro foi desenvolvida no software MatLab® (MathWorks®, EUA). Nesta rotina, o programa utilizava um intervalo espectral previamente definido para localizar a posição inicial e final de cada banda, bem como para calcular a largura, a área, intensidade máxima e posição máxima.

Inicialmente, tentou-se localizar a posição das bandas utilizando-se os valores de mínimo da primeira derivada, que correspondem a máximos e mínimos locais. Entretanto,

como as bandas de interesse estavam em regiões com muito ruído, utilizar o valor mínimo da derivada não se mostrou satisfatório para todos os casos, e utilizar o valor mínimo da absorbância se mostrou mais adequado.

Para o funcionamento da rotina, seis valores de número de onda eram fornecidos ao programa: dois para isolar a banda do resto do espectro (r1 e r2), e outros quatro valores utilizados na busca da posição inicial e final da banda (p1-p4). Esses valores eram diferentes para cada banda analisada, e foram determinados testando-se diferentes parâmetros. Os valores finais utilizados na análise de cada uma das bandas são apresentados na Tabela 6

Tabela 6 – Valores utilizados para na rotina desenvolvida no MatLab® para isolar a banda de interesse (r1 e r2) e encontrar sua posição inicial (p1 e p1) e final (p3 e p4).

Banda	r1 – r2 (cm⁻¹)	p1 – p2 (cm⁻¹)	p3 – p4 (cm⁻¹)
Amida I	1550 – 1750	1580 – 1600	1700 – 1720
Amida II	1480 – 1600	1505 – 1526	1575 – 1590
Carbonato	1250 – 1550	1270 – 1310	1515 – 1535
Amida III	1200 – 1350	1210 – 1230	1280 – 1310
Colágeno	1140 – 1240	1165 – 1190	1205 – 1225
Fosfato	900 – 1200	900 – 910	1145 – 1158

Os testes do programa desenvolvido para análise dos espectros foi realizado com um conjunto de 128 espectros extraídos de uma linha de 2×64 pixels da imagem espectral de uma amostra de osso do grupo controle.

4.6.4. Área da Rotina × Área com a Posição da Banda Fixa

A principal diferença entre a rotina desenvolvida para a análise dos espectros em relação a outras rotinas de análise foi quanto à posição da banda. Normalmente, no cálculo de área da banda o usuário fornece ao programa a posição inicial e final da banda. Na

rotina desenvolvida, o usuário fornece a região onde a posição inicial e final das bandas estão e o programa encontra a posição exata utilizando um dos métodos estabelecidos.

Para testar a eficiência da rotina de análise espectral desenvolvida, os valores de área das bandas de interesse de 128 espectros foram comparados quando calculados com a rotina e quando uma posição fixa de banda era utilizada. Os valores das posições das bandas foram obtidos utilizando-se a média das posições encontradas com a rotina criada. Para comparar os valores obtidos, a diferença entre os valores de área foi calculada e utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para testar a hipótese nula: se as diferenças entre as áreas calculadas com os dois métodos era incompatível com zero.

Também foi obtida a diferença média em porcentagem entre as áreas calculadas com os dois métodos para cada banda de interesse, considerando que a área calculada com a rotina correspondia a 100% da área da banda. Desta forma, pode-se avaliar a influência do método para diferentes bandas.

4.6.5. Correlação Intensidade $\times$ Razão das Áreas das Bandas

Para se assegurar que a razão entre as áreas das bandas do espectro não era influenciada pela intensidade do mesmo, foi feito um estudo da correlação da intensidade da banda do fosfato com a razão das áreas das bandas de amida I e amida II. Para isso, 128 espectros correspondentes a uma linha de 64 $\times$ 2 pixels da imagem espectral de uma amostra do grupo controle foram utilizados. A rotina desenvolvida no software MatLab® foi utilizada para se encontrar os valores de intensidade e calcular as áreas das bandas. O gráfico dos valores de intensidade da banda do fosfato pela razão entre as áreas das bandas de Amida I e Amida II foi construído utilizando-se o programa OriginPro 8 (Origin Lab Corporation, EUA), sendo testada a correlação dos dados utilizando coeficiente de correlação de Spearman.

4.6.6. Proporção entre as Áreas das Bandas

Para cada imagem espectral obtida, foi selecionada uma região de interesse que variava de acordo com a etapa do processo de reparação ósseo da respectiva amostra. Para as amostras do Grupo 0D ao Grupo 7D, que ainda não possuíam tecido ósseo neoformado,

foi selecionada uma região da interface entre o tecido ósseo e a lesão. Para as amostras do Grupo 15D ao Grupo 28D, que já possuíam tecido ósseo neoformado, foi selecionada uma região do novo tecido ósseo. E para as amostras do Grupo Controle, uma região do tecido ósseo maduro foi selecionada.

Os espectros da região de interesse foram exportados e analisados com a rotina desenvolvida. Em todos os espectros, a área de cada banda foi calculada, e posteriormente foram calculadas as razões entre as áreas das bandas de cada espectro, que representam a proporção dos componentes do tecido ósseo. As razões avaliadas foram: amida I/fosfato, amida II/fosfato, carbonato/fosfato, amida III/fosfato, e colágeno/fosfato.

Para cada amostra, calculou-se os valores de razões de cada um dos espectros da imagem, e a normalidade dos dados foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que, em todas as amostras, os valores de razões passaram pelo teste de normalidade, a proporção das bandas foi representada pelo valor médio da razão dos diferentes espectros que formavam a imagem espectral.

Primeiramente, para cada estágio de reparação óssea foram comparadas as proporções das bandas entre os grupos experimentais e o grupo controle quando o instrumento de corte utilizado: o laser de Er,Cr:YSGG ou broca *carbide* multilaminada em alta rotação. Devido ao pequeno número de amostras por grupo, a estatística foi realizada usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo a comparação entre os grupos realizadas com o pós-teste de Dunns, ambos com significância de 0,05.

Na comparação dos diferentes estágios de reparação ósseo, optou-se por não fazer distinção quanto ao instrumento de corte utilizado e com isso aumentar o número de amostras consideradas em cada grupo experimental. Comparou-se as proporção das áreas das bandas entre os diferentes estágios de reparação óssea e o Grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunns, ambos com significância de 0,05.

4.6.7. Largura da Banda do Fosfato

A largura da banda do fosfato $\nu_1 \nu_3$ (em aproximadamente 1010 cm^{-1}) dos diferentes espectros da região de interesse de cada amostra foi calculado utilizando a rotina desenvolvida. Verificou-se a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk. A

largura final considerada para cada amostra foi a média das larguras do espectros da região de interesse considerada para a respectiva imagem espectral.

Comparou-se a largura da banda de fosfato entre os estágios de reparação óssea e o grupo controle. Novamente, não foi feita distinção quanto ao instrumento de corte utilizado. Devido a constância e dispersão dos dados, optou-se por realizar a análise estatística com ANOVA e o pós-teste de Tukey, ambos com significância de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Procedimento Cirúrgico

O corte ósseo tanto com laser de Er,Cr:YSGG quanto com a broca multilaminada transcorreu sem dificuldades. O cirurgião que operou os dois equipamentos de corte relatou maior conforto e precisão utilizando o laser de Er,Cr:YSGG. Verificou-se que o corte a laser apresentava menor sangramento, além de bordas mais bem definidas do que o corte com a broca multilaminada, como pode ser observada na Figura 22, que mostra uma foto do retalho ósseo realizado com a broca multilaminada e com o laser de Er,Cr:YSGG durante o procedimento cirúrgico.

Figura 22 – Imagem do corte ósseo realizado com a broca multilaminada (à esquerda) e com o laser de Er,Cr:YSGG (à direita).

O conforto relatado pelo cirurgião, e a interface de corte melhor definida obtida para o Grupo Laser provavelmente foram consequências do efeito hemostático e do pequeno diâmetro do feixe laser, que juntos facilitam a visualização do campo cirúrgico e possibilitam uma maior precisão ao cirurgião ⁶². Por outro lado, o contato mecânico e a vibração da broca multilaminada são os responsáveis pela menor uniformidade na superfície de corte do Grupo Broca ¹⁶. Sendo essas mesmas razões, responsáveis pela alta taxa de perda de material causada pela broca multilaminada ¹, uma vez que não foi possível retirar o retalho ósseo feito em uma única peça, mas sim em pequenos fragmentos.

Desta forma, as observações realizadas durante o procedimento cirúrgico sugerem que o laser de Er,Cr:YSGG é mais eficiente que a broca multilaminada na realização do

corte ósseo. Entretanto, apesar de vantajoso, este fato não pode garantir uma reparação óssea mais rápida ou uma melhor qualidade do tecido ósseo formado.

5.2.Considerações sobre o Processo de Reparação Ósseo

O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo todas as normas de segurança e respeitadas as condições estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais. Entretanto, mesmo seguindo os protocolos, foi necessário rearranjar os grupos experimentais em decorrência de óbitos não induzidos no momento da cirurgia, devido reação anestésica. Desta forma, a quantidade de amostras por grupo teve que ser modificada. Optou-se por alterar o número de amostras na análise histológica, uma vez que o processo de reparação com essa técnica já é bastante conhecido. Ao final da separação, o Grupo 0D apresentou um maior número de amostras para a análise histológica do que os demais grupos (três amostras) , enquanto o Grupo 3D dias possuía um menor número de amostras (uma amostra).

Após o procedimento cirúrgico, decorrido o período definido de cada grupo, realizou-se a eutanásia dos animais e a região óssea de interesse foi removida e limpa, sendo o armazenamento das amostras realizado de acordo com a técnica de análise correspondente.

Macroscopicamente, a lesão óssea era visualizada até sete dias após o procedimento cirúrgico. No Grupo 15D, era possível identificar o contorno da remoção óssea preenchido por um tecido ósseo aparentemente mais claro e poroso. Nos Grupos 21D e 28D, a visualização do local da remoção óssea não era tão evidente, mas ainda era possível observar um tecido ósseo aparentemente menos denso.

Apesar do procedimento cirúrgico e pós-cirúrgico terem sido os mesmos em todos os animais, não foi observada a reparação óssea em ambos os lados da mandíbula de um dos animais do grupo 28D. Uma possível explicação está relacionada com a posição onde foi realizada a retirada do fragmento ósseo. Neste animal, a região de corte acabou sendo muito próxima da interface dente e osso, estimulando apenas uma cicatrização na região de corte, e não o remodelamento do tecido. Infelizmente, não foi possível rearranjar esse animal para a análise histológica, o que acarretou em um número menor de amostras nas análises espectroscópicas no Grupo 28D (duas amostras).

Por dificuldades experimentais enfrentadas quanto ao funcionamento do espectrômetro utilizado na aquisição das imagens espectrais, duas amostras não puderam ser analisadas, ambas referentes ao corte com a broca multilaminada, relativas ao Grupo 21D e Grupo 28D. Desta forma, a divisão de amostra por técnica de análise inicialmente planejada teve que ser alterada, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Total de amostras utilizadas para cada técnica de análise nos seis grupos experimentais considerando o instrumento de corte utilizado.

	Análise Histológica (amostras)		Análise Espectroscópica (amostras)	
	Laser Er,Cr:YSGG	Broca Multilaminada	Laser Er,Cr:YSGG	Broca Multilaminada
Grupo 0D	3	3	3	3
Grupo 3D	1	1	3	3
Grupo 7D	2	2	3	3
Grupo 15D	2	2	3	3
Grupo 21D	2	2	3	2
Grupo 28D	2	2	2	1

5.3. Análise Histológica

A análise histológica foi realizada para um melhor entendimento e caracterização dos efeitos dos instrumentos de corte nos diferentes estágios de reparação óssea. Foi possível avaliar os danos causados pelas ferramentas de corte ao tecido ósseo, e verificar as características e velocidade do processo de reparação após o corte com cada ferramenta.

Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para analisar as amostras morfológicamente, e diferentes escalas de aumento visualização das imagens foram utilizadas de acordo as estruturas observadas em cada etapa do processo de reparação óssea. A coloração com tricrômico de Masson foi utilizada nas lâminas em que a coloração poderia colaborar para uma melhor caracterização e entendimento do processo de

reparação. Nela os eritrócitos e o citoplasma das células são corados em vermelho e o colágeno em azul.

A Figura 23A apresenta uma imagem de um corte histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 0D após o corte ósseo com a broca multilaminada. Foi possível identificar a área de defeito ósseo, que exibia na interface do defeito um tecido amorfo, eosinofílico, com coagulação proteica intensa, sugerindo um dano térmico discreto. As bordas pouco definidas e o material amorfo na interface do defeito são resultados do corte por cisalhamento realizado pela broca multilaminada. Não foi observada alteração no osso remanescente adjacente a interface.

A Figura 23B apresenta uma imagem de um corte histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 0D após o corte ósseo com o laser de Er,Cr:YSGG. O grau de destruição foi levemente maior do que o observado quando a broca multilaminada foi utilizada. A interface do tecido exibe um dano térmico um pouco mais intenso no osso remanescente.

Figura 23 - Cortes histológico corados em HE de uma amostra do Grupo 0D após o corte ósseo com a broca multilaminada (esquerda) e com o laser de Er,Cr:YSGG (direita) – aumento original de 50×.

Em uma aumento maior (400×), observa-se presença de coagulação proteica em maior quantidade. Microscopicamente, o desenho do laser tem microentradas, sendo a interface de corte bem definida, um aspecto positivo para o processo reparação. Adjacente à área do defeito, é observada vasodilatação e áreas focais de hemorragia em alguns espécimes. É notável a área basofílica na interface do defeito com o tecido.

Figura 24 – Cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 0D após o corte ósseo com o laser (esquerda) e a broca multilaminada (direita) – com aumento de 400×.

A Figura 25 apresenta imagens de cortes histológicos corados em HE e Masson de uma amostra do Grupo 3D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG. Ainda é possível observar o dano térmico na borda do tecido, mas verifica-se que ele é um efeito pontual, restrito à interface de corte, e não se observa danos ou alterações no tecido remanescente.

Figura 25 – Cortes histológicos corados em HE (esquerda) e Masson (direita) de uma amostra do Grupo 3D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG- aumento original de 100×.

A Figura 26 apresenta a imagens de cortes histológicos corados em HE e Masson, respectivamente, de uma amostra do Grupo 7D após o corte com a broca multilaminada. Observa-se uma cicatrização parcial da área do defeito, com sua área sendo preenchida por um tecido conjuntivo denso bem celularizado, com áreas focais de ossificação imatura (sem remodelamento ósseo) e formação de feixes paralelos. Não se verifica atividade osteoclástica e ainda são observados espaços vazios.

Figura 26 –Cortes histológicos corados em HE (esquerda) e Masson (direita) de uma amostra do Grupo 7D após o corte com a broca multilaminada – aumento original de 5× e 10×, respectivamente

A Figura 27 apresenta as imagens de cortes histológicos corados em HE e Masson, respectivamente, de uma amostra do Grupo 7D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG. Observou-se o mesmo padrão de quando o corte foi realizado com a broca multilaminada, ou seja, uma cicatrização parcial da área do defeito com tecido conjuntivo fibroso, denso e bem celularizado, com áreas focais de ossificação imatura. Em algumas imagens ainda era possível observar uma área necrótica, típica da ação de ablação, que é bem visualizada na imagem do corte histológico corado em Masson.

Figura 27 – Cortes histológicos corados em HE (esquerda) e Masson (direita) de uma amostra do Grupo 7D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG – aumento original de 50× e 100×, respectivamente.

A Figura 28 apresenta cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 15D após o corte com a broca multilaminada. Observa-se áreas focais de ossificação em maior quantidade. É possível identificar a interface de corte, sendo a região do início da

formação bem definida. Verifica-se a presença de osteoblastos e osteoclastos indicando um processo de formação e remodelamento ósseo.

Figura 28 – Corte histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 15D após o corte com a broca multilaminada – aumento original de 5× e 40×.

A Figura 29 apresenta cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 15D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG. Como foi observado nos cortes em que a broca multilaminada foi utilizado, verifica-se áreas focais de ossificação em maior quantidade que no estágio anterior. No entanto, nas amostras do Grupo Laser não foi possível identificar a interface de corte. Com o maior aumento é possível identificar um grande número de osteoclastos e linhas de osteoblastos bem definidas, indicando um processo intenso de formação e remodelamento ósseo.

Figura 29 – Corte histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 15D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG foi utilizado – aumento original de 50× e 400×.

A Figura 30 apresenta as imagens histológicas com um aumento de 50× e 400× coradas em HE de uma amostra do Grupo 21D após o corte com a broca multilaminada. Verifica-se um espessamento das trabéculas, indicando uma maior especialização e

maturidade do tecido ósseo. Ainda é possível observar a presença de osteoblastos e osteoclastos em grande quantidade, indicando que o processo de aposição e absorção não foi encerrado.

Figura 30 – Coste histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 21D após o corte com a broca multilaminada – aumento original de 50× e 400×

A Figura 31 apresenta cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 21D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG. Foram observadas as mesmas características do grupo com o corte ósseo feito com a broca multilaminada, ou seja, um espessamento das trabéculas, e presença de osteoblastos e osteoclastos, indicando uma maior maturidade do tecido e um processo de aposição e absorção ainda em intensa atividade.

Figura 31 – Coste histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 21D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG – aumento original de 50× e 400×.

A Figura 32 apresenta cortes histológicos coradas em HE de uma amostra do Grupo 28D após o corte com a broca multilaminada. Observa-se um tecido mais denso, mais próximo à arquitetura de um tecido ósseo maduro. No aumento, ainda é possível

identificar uma linha osteoblástica pouco evidente e uma menor quantidade de osteoclastos, indicando a existência de processo mais voltado ao remodelamento do tecido do que à reparação do tecido.

Figura 32 – Cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 28D após o corte com a broca multilaminada – aumento original de 50× e 400×.

A Figura 33 apresenta cortes histológicos corados em HE de uma amostra do Grupo 28D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG. Nota-se o mesmo padrão do grupo onde o corte ósseo foi realizado com a broca multilaminada; as trabéculas são espessas e bem definidas, indicando um grau de maturidade maior.

Figura 33 – Corte histológico corado em HE de uma amostra do Grupo 28D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG – aumento original de 50× e 400×.

A Figura 34 apresenta as imagens histológicas de cortes corados em Masson de amostras do Grupo 28D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG (esquerda) ou com a broca multilaminada (direita). É possível verificar que 28 dias após a cirurgia, o tecido ósseo apresenta-se bem formado, com características de osso maduro independente do instrumento de corte utilizado.

Figura 34 – Cortes histológicos corados em Masson de amostras do Grupo 28D após o corte com o laser de Er,Cr:YSGG (esquerda) ou com a broca multilaminada (direita) – aumento original de 100×.

As principais diferenças observadas em relação ao instrumento de corte utilizado foram nos primeiros estágios do processo de reparação óssea. Quando o corte foi realizado com a broca multilaminada, foi observado pouco ou nenhum dano térmico, sendo a interface do corte pouco definida, uma característica do corte por cisalhamento realizada por esse tipo de equipamento. Já quando o corte ósseo foi realizado com o laser de Er,Cr:YSGG, a interface de corte foi muito bem delimitada, porém apresentou uma pequena área de necrose causada por dano térmico em toda a sua extensão (Figura 23).

O zona necrótica observada após o corte ósseo com o laser de Er,Cr:YSGG é limitada à interface de corte, não sendo verificados sinais de dano térmico no tecido adjacente. Como pode ser visualizado na Figura 24, a extensão de dano térmico observada nos cortes histológicos foi inferior a 50 µm, valor menor que o encontrado por Wang et al ¹⁷ em um estudo similar, em que o corte laser de Er,Cr:YSGG promoveu uma região necrótica de 70 a 90 µm. A diferença entre a extensão do dano térmico observada entre os estudos pode estar relacionado tanto a diferentes regiões do corte quanto às densidades de energia utilizadas ^{3,5,14}.

A região necrótica observada após corte com o laser de Er,Cr:YSGG é característica do processo de ablação laser ^{3,5,14,17}. Estudos utilizando a técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) para investigar o processo de ablação com o laser de Er,Cr:YSGG sugerem que a região necrótica ocorre quando o aumento de temperatura é superior a 150 °C ⁹¹. O limiar de temperatura para o comprometimento da reparação óssea ocorre quando temperaturas de 47°C são atingidas por mais de um minuto. Quando o limiar

é ultrapassado, há um dano celular irreversível, que em última análise, resulta no tecido ósseo podendo ser substituído por células de gordura ⁹².

A região basofílica causada pela ablação laser foi visualizada nas amostras do Grupo 3D e Grupo 7D, sendo que no Grupo 15D nenhum resquício de dano térmico foi observado. Considerando que 15 dias após o procedimento cirúrgico as amostras de ambos os grupos (laser e instrumento rotatório) estavam em estágios equivalentes do processo de reparação óssea, pode-se concluir que o corte com o laser de Er,Cr:YSGG não causou danos térmicos ao tecido remanescente que impedissem o processo de reparação óssea. Esse resultado sugere que mesmo que a interface de corte tenha alcançado valores de temperatura superiores à 150 °C (uma vez que foi observada uma zona de necrose), a área adjacente à lesão não atingiu valores de temperatura maiores que o limiar térmico de 47 °C, mostrando que os efeitos do laser de Er,Cr:YSGG no tecido ósseo são realmente locais, conforme reportado na literatura ^{12,17,60}.

Sete dias após a cirurgia, o processo de reparação óssea pareceu ligeiramente mais avançado no Grupo Broca do que no Grupo Laser, possivelmente devido ao maior dano térmico causado pelo laser de Er,Cr:YSGG. Muitos trabalhos relataram um atraso nos primeiros estágios do processo de reparação óssea após o corte com lasers no infravermelho em comparação ao observado com instrumentos cortantes usuais ^{17,19-22}. Acredita-se que o retardo no processo de reparação ocorra devido à região de necrose térmica causada pela ablação laser, uma vez que o organismo precisa reabsorver a camada carbonizada ^{20,93}.

Passados 15 dias do procedimento cirúrgico, não foi possível identificar a interface de corte nas amostras do Grupo Laser, enquanto nas amostras do Grupo Broca ainda era possível notar a delimitação entre o tecido remanescente e o tecido neoformado em algumas regiões (Figura 28). Uma possível explicação para melhor integração do tecido neoformado nas amostras do Grupo Laser neste período pode estar no perfil do corte realizado com o laser de Er,Cr:YSGG.

Apesar das pequenas diferenças encontradas nos primeiros estágios de reparação óssea entre as duas ferramentas de corte utilizadas, 21 dias após a cirurgia já não foi observada nenhuma diferença relevante entre as amostras do Grupo Laser e Grupo Broca, e o processo de reparação ósseo em ambos os grupos estava de acordo com o que era

esperado para o período. O mesmo foi observado 28 dias após o procedimento cirúrgico, onde as amostras já se apresentavam em um estágio mais estável do processo de reparação.

Wang et al utilizaram o laser de Er,Cr:YSGG na realização de um defeito ósseo na região da mandíbula de coelhos adultos. Seus resultados mostraram que o corte com laser promoveu dano térmico localizado (com menos de 100 μm) em ambas as regiões de estudo. Sete dias após a cirurgia, ainda não era possível observar grandes alterações no processo de reparação óssea, e apenas 14 dias após a cirurgia, foi identificado tecido de granulação com algumas zonas de ossificação.¹⁷

A comparação dos resultados obtidos para as amostras do Grupo Laser com os resultados obtidos por Wang et al mostram que o processo de reparação observado neste estudo foi ligeiramente mais rápido, uma vez que 7 dias após a cirurgia com o laser já foi observado tecido conjuntivo. As principais diferenças entre os trabalhos são em relação à região da cirurgia e a densidade de energia utilizada. Uma vez que a zona necrótica reportada por Wang et al foi maior que a observada neste trabalho, é possível que o uso de uma densidade de energia menor tenha causado um menor dano térmico e uma reparação óssea mais rápida.

Esse resultado sugere que a zona necrótica formada no processo de ablação laser influencia diretamente na velocidade do processo de reparação óssea, e reforça a importância da seleção dos parâmetros de irradiação na utilização do laser em procedimentos cirúrgicos.

5.4. Análise Espectroscópica

A técnica de espectroscopia FTIR já foi amplamente utilizada na caracterização de tecido mineralizados^{70,79,84,94}, entretanto poucos estudos foram realizados na tentativa de usar esta técnica na caracterização do processo de reparação óssea, sabendo-se apenas que algumas das características do espectro infravermelho são associadas à maturidade do tecido³⁹. Desta forma, o uso da técnica de espectroscopia FTIR na caracterização de diferentes estágios do processo de reparação óssea pode fornecer novas informações sobre as mudanças estruturais e moleculares que ocorrem no osso durante esse processo.

5.4.1. Aquisição das Imagens

O contato entre a amostra e o cristal do acessório ATR é um fator determinante na qualidade dos espectros obtidos, sendo esse o motivo para a necessidade do polimento das amostras antes das medidas espectroscópicas utilizando a técnica de ATR-FTIR. Objetivando melhorar o contato entre a amostra e o cristal do acessório ATR, substituiu-se a peça de safira normalmente utilizada para pressionar a amostra ao cristal do equipamento por peça metálica.

A Figura 35 apresenta as imagens espectrais obtidas de uma mesma amostra quando foram utilizadas diferentes peças para pressionar a amostra ao cristal. As medidas foram realizadas sem mover a amostra, portanto são referentes a uma mesma região. O parâmetro utilizado para formar a escala das imagens espectrais foi a intensidade da banda do fosfato, por essa ser uma banda intensa e estável no espectro infravermelho do tecido ósseo. É importante lembrar que na escala de cores utilizada pelo programa, cores quentes representam maior intensidade e cores frias menor intensidade, como ilustrado na Figura 14.

Figura 35 - Imagem obtida quando utilizada (A) a peça de safira; (B) a peça metálica.

Verificou-se que a imagem espectroscópica gerada quando a peça metálica foi utilizada (Figura 35B) apresentou mais regiões com cores quentes que a imagem adquirida quando foi utilizada a peça de safira (Figura 35A). A maior intensidade obtida indica um maior contato entre a amostra e o cristal, que possibilitou uma maior penetração da onda evanescente na amostra e portanto uma maior absorção. Se a amostra não está em contato total com o cristal do acessório ATR, uma pequena quantidade de ar fica entre a amostra e o cristal. A onda evanescente é absorvida e atenuada por essa camada de ar antes de chegar

na amostra, e a intensidade do espectro de absorção será afetada. Uma menor intensidade torna o espectro mais sensível à variações causadas por variações no ambiente e ruído.

Além de proporcionar um melhor contato entre amostras e o cristal do acessório ATR, a utilização da peça metálica possibilita o uso de uma ferramenta de torque que controla a força (pressão) sobre a amostra, o que colabora com a padronização do experimento. Desta forma, foram duas as razões para que a peça metálica fosse utilizada nas medidas espectroscópicas do tecido ósseo.

Uma dificuldade enfrentada na aquisição dos dados foi quanto ao posicionamento da amostra sobre o cristal de diamante do acessório ATR. As dimensões do cristal do acessório ATR eram pequenas para que pudesse se observar em uma mesma imagem espectral a interface do corte ósseo ou o tecido neoformado, juntamente com a região do osso não alterada (osso maduro). Também não era possível assegurar no posicionamento da amostra qual era a exata região analisada, uma vez que no equipamento não havia câmera ou microscópio que mostrasse a imagem da amostra correspondente à imagem espectral formada. Por essa razão, a ideia inicial de utilizar a mesma imagem espectral para comparar a região do osso controle com a região de reparação óssea não pôde ser realizada, e as regiões tiveram que ser analisadas separadamente.

5.4.2. Bandas Analisadas

Nos espectros que formavam as imagens espectrais obtidas para as diferentes amostras analisadas, foi possível identificar as bandas de amida I, amida II, amida III, colágeno (1200 cm^{-1}) e fosfato em todos os espectros. No entanto as bandas de carbonato (1410 cm^{-1} e 1445 cm^{-1}) e colágeno (1335 cm^{-1}), sobrepostas umas às outras, nem sempre eram identificadas individualmente em todos os espectros adquiridos de uma mesma amostra, e muitas vezes eram visualizadas apenas como uma grande banda, como pode ser visto na Figura 36.

Em estudos anteriores envolvendo os efeitos que a irradiação do laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo, as bandas de carbonato (1410 cm^{-1} e 1445 cm^{-1}) e colágeno (1335 cm^{-1}) foram avaliadas separadamente. Entretanto, os resultados das análises não foram significativos, diferentemente do que ocorreu para as outras bandas de colágeno e carbonato avaliadas no mesmo estudo⁶⁸. Acredita-se que isto ocorra devido à sobreposição

das bandas, que fazem com que as áreas e posições das bandas variem muito, dificultando a análise individual dessas bandas.

Figura 36— Bandas de carbonato (1410 cm^{-1} e 1445 cm^{-1}) e colágeno (1335 cm^{-1}), sobrepostas umas às outras, em (A) não é possível diferenciá-las; em (B) é possível diferenciá-las.

Desta forma, devido às dificuldades de visualizar as bandas e analisá-las individualmente, decidiu-se por analisar as bandas de carbonato (1410 cm^{-1} e 1445 cm^{-1}) e colágeno (1335 cm^{-1}) como uma única grande banda.

5.4.3. Imagens espectrais

A Figura 37 apresenta a imagem espectral de uma amostra do Grupo Controle (osso íntegro) utilizando a intensidade da banda do fosfato como parâmetro para formar a escala da imagem espectral. Verifica-se que apesar de se tratar de uma amostra de osso macroscopicamente homogênea, a técnica de espectroscopia é sensível às variações existentes na composição e estrutura da amostra.

Para formação da imagem espectral, os parâmetros utilizados na escala de cor foram: a área das bandas de fosfato ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), a área da banda amida I ($1680\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), a área da banda amida II ($1580\text{-}1480$) e a área da banda carbonato ($1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$). Os agrupamentos pela área da banda da Amida III e do colágeno foram desprezados, uma vez que o cálculo automático da área de bandas com baixa intensidade não se mostrou confiável (Figura 21).

Figura 37 - Imagem espectral de uma amostra do Grupo Controle (osso maduro) utilizando a intensidade da banda do fosfato como parâmetro para formar a escala da imagem espectral.

A Figura 38 apresenta as imagens espectrais considerando os diferentes compostos para a realização do agrupamento. Verifica-se que o agrupamento utilizando as bandas de amida I, amida II e carbonato são bastante semelhantes, o que é esperado, uma vez que essas bandas são encontradas na mesma região do espectro, sendo inclusive sobrepostas, e portanto sujeitas as mesmas variações de intensidade. A imagem espectral formada com a banda do fosfato foi a mais homogênea quando a escala automática do programa foi utilizada.

Independente do parâmetro utilizado na escala de cores das imagens, nenhuma imagem apresentou configuração homogênea, indicando que as diferenças captadas pelas imagens espectrais são referentes a uma variação composicional da amostra e não de diferenças individuais das bandas. O software utilizado era sensível à pequenas variações, e nem sempre a diferença de cores representada na imagem revela uma grande diferença nos espectros.

Figura 38 - Imagens espectrais considerando os diferentes parâmetros do espectro para formar a escala de cores da imagem (cores quentes representam valores maiores do parâmetro utilizado, e cores frias valores menores).

O padrão de cor formado nas imagens espectrais lembra o aspecto trabeculado observado nas imagens histológicas, principalmente naquelas que utilizam as bandas dos compostos orgânicos como parâmetro para formar a escala. Esse fato sugere que a heterogeneidade observada sejam uma característica do tecido ósseo, e que a técnica de FTIR é sensível as variações estruturais do tecido.

Devido à heterogeneidade das imagens espectrais, e também aos problemas observados no cálculo das área das bandas utilizando o *CytoSpec*, optou-se por criar uma rotina no software MatLab® para analisar cada espectro individualmente. Para isso, os espectros que formavam a imagens foram exportados em arquivos individuais na extensão “.dat”.

Para a exportação dos espectros, era realizada a seleção da região de interesse nas imagens espectrais. Esse passo era especialmente importante para as amostras do Grupo 0D, Grupo 3D e Grupo 7D, pois nestes grupos ainda não havia tecido neoformado preenchendo a região em que o fragmento ósseo, e portanto a região de interesse era a interface entre o tecido ósseo e a região de lesão. Um exemplo da seleção da região de interesse quando a interface da região de corte foi selecionada é apresentado na Figura 39.

A principal dificuldade na seleção da região de interesse foi que o *CytoSpec* permite que apenas 24 pontos sejam utilizados na seleção, o que limita as formas e contornos utilizadas para delimitar a região de interesse. Outro problema é que não é possível visualizar os espectros da região enquanto se realiza a seleção e também não é possível ver as regiões da amostra que já foram selecionadas, sendo estes fatores que dificultam a seleção da região analisada.

Figura 39 – Seleção da região de interesse da imagem espectral de uma amostra do Grupo 0D.

5.4.4. Considerações sobre a rotina desenvolvida

Desenvolveu-se uma rotina em MatLab® para analisar os espectros que formavam a imagem espectral. A principal diferença em relação aos programas usualmente utilizados é quanto a posição das bandas. Enquanto normalmente a posição das bandas é fornecida pelo usuário e utilizada em todos os espectros sem distinção, a rotina desenvolvida tenta considerar as variações de cada espectro.

Na rotina desenvolvida, a posição inicial e final de cada banda era obtida encontrando-se o valor mínimo de absorbância dentro de um intervalo previamente fornecido para o programa. Avaliou-se a possibilidade de utilizar a primeira derivada para encontrar as posições de mínimo locais, entretanto o ruído dos espectros dificultava a localização dos mínimos de forma adequada, e o método apresentou baixa eficácia.

De modo geral, a rotina desenvolvida se mostrou bastante eficiente para encontrar a posição inicial e final das bandas correspondentes à amida I, amida II, amida III, carbonato e fosfato (Figura 40A - Figura 40E). Entretanto, na banda correspondente ao colágeno, nem todos espectros analisados apresentaram bons ajustes de reta para o cálculo de área da banda, resultando em áreas menores que a real ou até mesmo negativas (Figura 40F), o mesmo problema observado para a banda de amida III e colágeno quando posições fixas eram utilizadas. É importante ressaltar, que o problema observado para banda do colágeno não ocorria em todos os espectros, sendo que na maioria deles as posições inicial e final da banda do colágeno eram encontradas corretamente.

Conforme mencionado anteriormente, erros na localização da banda acarretam em erro no ajuste de reta utilizado no cálculo de área, que por sua vez, resultam em áreas menores que as reais, ou até mesmo apresentando valores negativos.

A banda do colágeno foi a menor banda analisada, e sofre grande influência das condições de aquisição da imagem espectral e do ruído no espectro. Por ser suscetível às variações externas, a sua forma e posição variam de um espectro para outro, e por isso as condições estabelecidas na rotina não foram adequadas para todos os espectros. Para uma melhor caracterização da banda do colágeno, são necessários novos estudos para o desenvolvimento de uma metodologia para encontrar a posição inicial e final das bandas que seja mais flexível às variações do espectro.

Figura 40 – Ajuste de reta para o cálculo de área das bandas utilizando a rotina desenvolvida. Verifica-se que o ajuste da banda do colágeno apresenta o mesmo problema que quando uma posição fixa de banda era utilizada.

Apesar dos problemas observados no cálculo da área do colágeno, a rotina desenvolvida se mostrou eficaz em encontrar a posição inicial e final das bandas na maioria dos espectros. Considerando que os problemas reportados na rotina para a banda do colágeno também eram observados na banda de Amida III quando eram utilizadas posições fixas, pode-se dizer que a rotina desenvolvida foi mais eficiente em calcular as áreas das bandas do que o método utilizado pelo *CytoSpec*.

5.4.5. Correlação Intensidade $\times$ Razão das Áreas das Bandas

Para assegurar que a razão entre as áreas das bandas do espectro não era influenciada pela intensidade do mesmo, foi feito um estudo da correlação da intensidade da banda de amida II com a razão das áreas das bandas de amida I e fosfato. O gráfico dos valores de intensidade da banda de amida II pela razão entre as áreas das bandas de Amida I e fosfato é apresentado na Figura 41, sendo calculado o coeficiente de correlação de postos de Spearman.

Figura 41 - Gráfico dos valores de intensidade da banda do fosfato pela razão entre as áreas das bandas de Amida I e fosfato.

Verificou-se que não há correlação entre os valores da intensidade dos espectros com o valor da razão entre as áreas de duas bandas ($r = -0,036$). Com isso, garantimos que a proporção entre as áreas das bandas não é afetada pela diferença de intensidade dos espectros, e que essa proporção já exclui as possíveis diferenças de intensidade entre os

espectros devido à fatores experimentais, por exemplo, o tempo da aquisição do espectro em relação ao tempo de aquisição do background.

5.4.6. Área da Rotina $\times$ Área com a Posição da Banda Fixa

Para testar a eficiência da rotina de análise espectral desenvolvida, os valores de área de 128 espectros foram comparados quando calculados com a rotina e quando era utilizada uma posição fixa de banda. A Figura 42 apresenta o gráfico dos valores médios das áreas das bandas obtidas com os dois métodos e também a diferença média entre estes valores de área.

A maior diferença entre os valores de área calculados com os dois métodos foi observada na banda de colágeno (89%) e as menores diferenças na banda da amida I e do fosfato (1% e 2% respectivamente). É possível perceber que a diferença entre os valores de área entre os dois métodos está relacionada ao tamanho da banda, sendo a diferença maior quanto menor a área analisada. Uma vez que as bandas menores são mais sensíveis às variações no momento da aquisição dos espectros, é esperado que sofram uma maior variação em sua posição inicial e final, e por isso, são as mais afetadas quando se utiliza uma posição fixa de banda.

Figura 42 – (A) Gráfico dos valores médios das áreas das bandas obtidas com os métodos e da diferença média entre os valores de área obtidos. A escala logarítmica foi utilizada para uma melhor visualização dos dados. (B) Gráfico dos valores médios das áreas das bandas obtidas com os métodos e da diferença média entre os valores de área obtidos com a escala ajustada para a visualização da banda do colágeno.

Os resultados estatísticos mostraram que a diferença entre os valores de área calculados com os dois métodos foi incompatível com zero em todas as bandas, indicando que mesmo nas bandas em que a diferença entre os valores de área eram pequenos, como na amida I e no fosfato, a metodologia utilizada para calcular as áreas das bandas pode afetar os resultados. O cálculo de área utilizando uma posição de banda fixa foi sempre menor que o valor utilizando a rotina desenvolvida, sugerindo que a área da banda é normalmente subestimada quando se utiliza uma mesma posição de banda para diferentes espectros.

5.4.7. Razão entre as Áreas das Bandas: Instrumentos de Corte

Neste estudo foi avaliada a razão entre as áreas das bandas do espectro de infravermelho, com o objetivo de detectar diferenças nas proporções e quantidades dos componentes presentes na amostra^{84,87,88}. É importante ressaltar que esse tipo de análise é relativa, isto é, mostra a proporção de uma banda dos espectros em relação a outra, não sendo possível afirmar qual dos dois componentes utilizados na razão é responsável pela alteração observada, apenas utilizando as informações obtidas pela técnica de espectroscopia FTIR.

As bandas avaliadas neste estudo foram as de fosfato $\nu_1\nu_3$ (900–1150 cm^{-1}), colágeno (1175-1210), amida III (1210-1290 cm^{-1}), carbonato (1285-1520), amida II (1510-1580 cm^{-1}) e amida I (1580-1710 cm^{-1}). A área da banda do fosfato foi utilizada na normalização das demais áreas por ser uma banda bastante intensa e definida, que não sofre a influência dos modos de vibração de outros compostos, sendo portanto exclusivamente relacionada à parte mineral do tecido ósseo.

Dentre as proporções avaliadas, a razão entre as áreas da banda da amida I e fosfato $\nu_1\nu_3$ representa a proporção entre os compostos da matriz orgânica e o conteúdo mineral, chamada de razão matriz orgânica/mineral^{72–74}. As proporções entre as áreas das bandas de Amida III e colágeno com a área da banda do fosfato também estão relacionadas com o conteúdo orgânico dos tecidos mineralizados^{84,87,88}. Estes compostos são menos influenciados por outras bandas de absorção, como ocorre para amida I e amida II em relação à água e carbonato.

Infelizmente, devido às especificações do detector do espectrofotômetro, a região espectral analisada foi limitada à região de 4000 cm^{-1} até 900 cm^{-1} , impossibilitando a

análise da região de 900 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , onde estão localizadas bandas importantes da parte mineral do osso, como as de carbonato ν_2 ($840\text{--}890\text{ cm}^{-1}$) e fosfato ν_4 (604 cm^{-1}). Por esse motivo, não foi possível avaliar o conteúdo relativo de carbonato presente nas amostras, dado pela razão entre as bandas de carbonato ν_2 ($840\text{--}890\text{ cm}^{-1}$) e fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$)^{39,70}.

Avaliou-se as proporções dos componentes do tecido ósseo quanto ao instrumento de corte utilizado no procedimento cirúrgico, comparando-se as razões das áreas das bandas do espectro infravermelho do Grupo Controle, do Grupo Laser e Grupo Broca em cada período de reparação óssea estudado.

Os gráficos da Figura 43 à Figura 48 mostram as proporções entre as áreas das bandas analisadas do Grupo Laser e do Grupo Controle nos estágios do processo de reparação do tecido ósseo. Estatisticamente, não foram observadas diferenças entre os grupos em nenhum estágio do processo de reparação. Também não foram verificadas tendências no comportamento das bandas.

Figura 43 – Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, imediatamente após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Figura 44 – Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, três dias após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Figura 45 – Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, sete dias após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Figura 46– Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, quinze dias após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Figura 47 – Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, vinte e um dias após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Figura 48 – Comparação entre o Grupo Laser e o Grupo Broca dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, carbonato e colágeno, normalizados pela área da banda do fosfato, vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Os resultados obtidos na análise histológica mostraram que o laser de Er,Cr:YSGG promoveu um dano térmico ligeiramente maior na interface de corte do que a broca multilaminada, sendo possível observar nos cortes histológicos uma área de necrose na região do corte até sete dias após o procedimento cirúrgico. Entretanto, essa diferença não foi observada nas análises espectroscópicas, como pode ser visualizado na Figura 43.

Na análise histológica, verificou-se que não houve diferenças significativas entre o processo de reparação óssea do Grupo Laser e do Grupo Broca após 15 dias do procedimento cirúrgico. Também não se observou diferenças entre estes grupos utilizando a técnica espectroscópica (Figura 46- Figura 48).

O estudo da proporção das bandas do espectro no infravermelho não foi eficaz em demonstrar a influência de diferentes ferramentas de corte no processo de reparação óssea. A heterogeneidade do tecido ósseo e o total de amostras utilizadas podem ter contribuído para o resultado obtido. Ainda podem ser testadas outras técnicas de análises dos espectros na tentativa de evidenciar as diferenças observadas na análise histológica, como a proporção entre as sub-bandas do fosfato e amida I. Portanto, o potencial da técnica de espectroscopia FTIR na diferenciação dos efeitos de diferentes ferramentas de corte no processo de reparação óssea não pode ser descartado.

5.4.8. Razão entre as Áreas das Bandas: Estágios de Reparação

Para avaliar a proporção dos componentes do tecido ósseo nos diferentes estágios da sua reparação em relação ao osso controle, os dados foram reagrupados de forma a não haver distinção quanto à ferramenta de corte utilizada durante a cirurgia (instrumento rotatório ou laser de Er,Cr:YSGG). Essa decisão foi tomada considerando o número reduzido de amostras por grupo e com base nos resultados anteriores, comparando os dois instrumentos de corte em diferentes estágios da reparação óssea em que não foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos.

A Figura 49 apresenta os valores da razão entre as áreas das bandas de amida I e fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e com o grupo controle. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 49 – Valores médios da razão entre as áreas das bandas de amida I e fosfato nos diferentes estágios da reparação e no Grupo Controle. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

A razão entre as bandas de amida I e fosfato está relacionada com a proporção entre os compostos da matriz orgânica e o conteúdo mineral (razão matriz/mineral). Sabe-se que essa razão tende a diminuir com maturidade do tecido³⁹. Entretanto, comparando-se os valores de razão obtidos para os diferentes estágios de reparação óssea, não foi observada nenhuma tendência.

A banda de Amida I é sobreposta a um modo de vibração da água, sendo difícil determinar a influência de cada composto no comportamento da banda. As amostras analisadas por espectroscopia foram mantidas em ambiente úmido com temperatura controlada até 96h antes das análises, quando foram transferidas para um dissecador com sílica para que tivessem hidratação padronizada. Portanto, as amostras não estavam totalmente desidratadas, sendo possível que a banda da água tenha afetado a análise da banda de amida I. Estudos envolvendo a irradiação de amostra de tecido ósseo com o laser de Er,Cr:YSGG mostraram que banda da Amida I apresenta uma comportamento intermediário entre a banda da água e dos compostos orgânico⁸⁴, destacando a influência que a água tem no comportamento desta banda.

A Figura 50 apresenta os valores da razão entre as áreas das bandas de amida II e amida III com a área do fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e para o Grupo Controle. Optou-se por apresentar as razões destas duas bandas em um mesmo gráfico para evidenciar seu comportamento semelhante. Para que a escala do gráfico fosse compatível, os valores de razão de cada banda foram normalizados pelo seu respectivo valor máximo. Foram observadas diferenças estatísticas entre o Grupo 15D e o Grupo Controle em ambas as bandas.

Figura 50 – Valores médios da razão entre as áreas das bandas de amida II e amida III normalizadas pela banda do fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e no Grupo Controle. Os dados foram normalizados pelo valor máximo de cada grupo.

Conforme já mencionado, as proporções entre as áreas da banda Amida II e Amida III em relação à banda do Fosfato também estão relacionadas com o conteúdo orgânico dos tecidos mineralizados^{84,87,88}. Observando-se o gráfico da Figura 50, nota-se que a proporção de conteúdo orgânico nas amostras aumentou gradativamente do terceiro até o decimo quinto dia, quando atingiu seu ápice, diminuindo nos estágios mais avançados do processo de reparação. Essa tendência é corroborada com o observado nas análises histológicas, na qual verificou-se que de três a quinze dias após o procedimento cirúrgico ocorre a formação do tecido conjuntivo de granulação na região da lesão. A partir do décimo quinto dia, a mineralização dessa matriz começou a ocorrer de forma mais intensa.

A tendência na proporção entre a matriz orgânica e o conteúdo mineral observada na análise das bandas de Amida II e Amida III sugere que a técnica de espectroscopia FTIR é sensível às alterações de conteúdo orgânico no processo de reparação do tecido ósseo.

Essa tendência também foi observada no estudo da banda do colágeno, como pode ser visualizada na Figura 51, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os diferentes estágios do processo de reparação ósseo.

Figura 51 – Valores médios da razão entre as áreas das bandas de colágeno e fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e em um grupo controle. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Também realizou-se a análise da razão entre a banda do carbonato e a banda do fosfato, apresentada na Figura 52. Não se observou nenhuma diferença estatística ou tendência entre os dados. O resultado é esperado, uma vez que nesta região estão

sobrepostos modos de vibração dos componentes orgânicos, minerais e da água, o que torna difícil observar o comportamento de qualquer um destes componentes utilizando esta banda.

Figura 52 – Valores médios da razão entre as áreas das bandas de carbonato e fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e em um grupo controle, As barras de erro correspondem ao erro padrão da média dos dados.

Na análise histológica, verificou-se que o corte ósseo com o laser de Er,Cr:YSGG promoveu um ligeiro dano térmico no tecido remanescente. A literatura sugere que a zona necrótica observada no Grupo Laser é decorrência de um aumento de temperatura superior à 150 °C⁹¹. Esse aumento é alto o suficiente para promover degradação dos compostos orgânicos no tecido ósseo⁸⁶. Entretanto, não se observou diferenças entre o Grupo Controle e o Grupo 0D nos resultados da análise espectroscópica, mesmo quando só o Grupo laser foi considerado.

A técnica de FTIR já se mostrou eficaz em detectar alterações em tecidos mineralizados causadas pelo aumento de temperatura. Estudos que utilizaram a técnica de FTIR para avaliar dentina submetida à diferentes aumentos de temperatura demonstraram que um aumento de temperatura de 150 °C foi suficiente para causar uma redução de 50% no valor das áreas das bandas dos compostos localizados entre 1150 cm⁻¹ 1350 cm⁻¹ (Amida III e colágeno)⁹⁵. A técnica também já se mostrou eficaz em detectar variações causadas pela irradiação do laser de Er,Cr:YSGG em ossos, dentina e esmalte^{37,56,84,88}.

Uma hipótese para a falta de tendências no Grupo 0D está relacionada com a seleção da área de interesse nas imagens espectrais, que pode ter considerada uma região

maior que a zona de dano térmico. Conforme foi observado na análise histológica, o dano térmico causado pelos instrumentos de corte ao tecido foi pouco extenso, e o tecido adjacente à interface praticamente não foi afetado. Portanto, ao selecionar-se a região de interesse, espectros relativos ao tecido adjacente (não afetado durante o corte ósseo) podem ter sido considerados na análise, o que prejudicaria a diferenciação dos grupos. Essa hipótese é reforçada pela barra de erro obtida em cada grupo. Nota-se que esta última é maior no Grupo Laser e Grupo Broca, em relação ao Grupo Controle, indicando uma maior dispersão dos dados nestes grupos.

5.4.9. Largura da Banda do Fosfato

A banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$) desempenha um papel importante nas análises espectroscópicas dos tecidos mineralizados, não apenas por ser uma banda bem definida e intensa mas por estar relacionada a diversas propriedades do tecido ósseo, como maturidade, cristalinidade e conteúdo de ácido fosfórico. No domínio desta banda são encontrados diversos sub-bandas geradas pelos íons de fosfato, como a centrada em 1030 cm^{-1} , relacionada ao estiramento assimétrico do fosfato ($\nu_3\text{PO}_4$) modo de vibração associado à apatita não-estequiométrica localizado em 1120 cm^{-1} ⁷⁸.

A análise das sub-bandas são utilizadas para determinar os índices de cristalinidade e maturidade do tecido ósseo, entretanto é difícil determinar com precisão a quantidade e localização das sub-bandas. Paschalis et al. utilizou a segunda derivada do espectro e determinou 11 picos no domínio da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$) ⁹⁶, entretanto esse método questionável quanto a sua estabilidade e reprodutibilidade ⁷⁹. O processo mais utilizado é decompor o domínio da banda de fosfato $\nu_1\nu_3$ em cinco sub-bandas (1110 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} e 962 cm^{-1}) ^{31,45}. Entretanto, Rey et al. demonstrou que a posição, intensidade e a quantidade de bandas variam de acordo com o tecido mineralizado, o seu estágio de maturidade, e até o ambiente em que são realizadas as medidas espectrais ⁷⁷.

Visto a dificuldade em identificar e separar as sub-bandas do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$), optou-se por estudar a largura da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ em uma primeira análise. A largura da banda está associada aos modos de vibração que a compõe, e por isso

uma alteração na largura da banda do fosfato pode indicar uma alteração de cristalinidade e maturidade.

A Figura 53 apresenta os valores da razão entre as áreas das bandas de colágeno e fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e em um osso controle. As diferenças estatísticas encontradas são representadas no gráfico. Letras iguais representam dados sem diferença estatística e letras diferentes dados que diferem estatisticamente.

Figura 53– Valores médios da razão entre as áreas das bandas de colágeno e fosfato nos diferentes estágios da reparação óssea e em um osso controle

A Figura 53 mostra que a largura da banda do fosfato diminui gradativamente até sete dias após o procedimento cirúrgico, e lentamente tende a aumentar a partir deste período. As análises histológicas demonstraram que entre 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico o processo de mineralização da matriz celular pelos osteoclastos já está em andamento, e que 21 dias após a cirurgia a mineralização das amostras aumenta gradativamente. As semelhanças entre o comportamento observado no gráfico com os resultados da análise histológica sugerem que a largura da banda do fosfato está diretamente relacionada com o grau de mineralização do tecido ósseo.

O índice de maturidade é calculado utilizando a razão da área das sub-bandas localizadas em 1030 cm⁻¹ e 1010 cm⁻¹ ⁷⁹, entretanto apenas com a largura da banda do

fosfato não se pode inferir nada sobre o comportamento das sub-bandas. Em contra partida, a maturidade está relacionada à proporção de domínios de apatita e não apatita na estrutura do tecido, que tende a aumentar com o processo mineralização do tecido. Desta forma, os resultados indicam que a largura da banda do fosfato está relacionada com maturidade do tecido.

Mais estudos são necessários para podermos confirmar se a largura da banda do fosfato esta diretamente relacionada com maturidade do tecido. Os resultados observados mostraram que a largura da banda do fosfato $\nu_1\nu_3$ ($900-1180\text{ cm}^{-1}$) apresentou comportamento semelhante à mineralização das amostras, reforçando o potencial da tendência de espectroscopia FTIR na caracterização do processo de reparação óssea.

5.5.Considerações Finais

Poucos estudos foram realizados utilizando a técnica de FTIR na tentativa de estudar o processo de reparação ósseo, sendo a maioria dos estudos voltados à recuperação de fraturas decorrentes de osteoporose^{72,97-99} ou sobre o desenvolvimento natural do tecido^{94,100}, não sendo possível uma comparação direta dos resultados obtidos com a literatura.

A técnica de espectroscopia FTIR se mostrou eficaz na caracterização dos diferentes estágios de reparação óssea. Observou-se uma tendência de aumento na proporção de compostos orgânicos até o Grupo 15D, após o qual houve um aumento na proporção de compostos inorgânicos indicando maior mineralização após este período, o que é corroborado pela análise histológica, mostrando o potencial da técnica de espectroscopia FTIR na obtenção de novas informações sobre as mudanças estruturais e moleculares do tecido ósseo

Com os resultados obtidos na análise espectroscópica, ainda não foi possível detectar diferenças quanto ao instrumento de corte utilizado (laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada), entretanto outras características espectrais ainda podem ser avaliadas para tentar caracterizar o efeito de cada ferramentas de corte no processo de reparação óssea.

A análise histológica sugere diferenças nos primeiros estágios do processo de reparação quanto ao instrumento de corte utilizado. O laser de Er,Cr:YSGG causou um dano térmico ligeiramente maior que a broca multilaminada, e por isso o processo de

reparação óssea sofreu um pequeno atraso em seus primeiros estágios. A partir do Grupo 21D, não foram observadas diferenças no processo de reparação em relação às ferramentas de corte, não sendo observadas diferenças significativas em relação a qualidade e velocidade da reparação óssea entre o Grupo Laser e o Grupo Broca.

Durante o procedimento cirúrgico, foram notáveis as vantagens do laser de Er,Cr:YSGG em relação a broca multilaminada. O laser possibilitou uma maior precisão de corte e promoveu efeito hemostático, o que facilitou a visualização do campo cirúrgico, e tornando o procedimento mais rápido e confortável para o cirurgião.

6. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a técnica de espectroscopia FTIR tem potencial na caracterização dos diferentes estágios de reparação óssea. Observou-se uma tendência de aumento na proporção de compostos orgânicos até o Grupo 15D, após o qual houve aumento na proporção de compostos inorgânicos indicando maior mineralização após este período, o que é corroborado pela análise histológica. Entretanto, com as técnicas de análises utilizadas, ainda não foi possível detectar diferenças quanto ao instrumento de corte empregado (laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada).

Os protocolos de aquisição e análise desenvolvido foram eficazes na obtenção das imagens espectrais dos diferentes estágios de reparação óssea.

Com a análise histológica foi possível detectar diferenças nos primeiros estágios de reparação do tecido após o corte ósseo realizado com o laser de Er,Cr:YSGG e a broca multilaminada. Vinte e um (21) dias após o procedimento cirúrgico, ambos os grupos se encontravam em estágios similares do processo de reparação óssea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee, Y. M., Tu, R. Y., Chiang, a C. & Huang, Y. C. Average-power mediated ultrafast laser osteotomy using a mode-locked Nd:YVO4 laser oscillator. *J. Biomed. Opt.* **12**, 060505 (2007).
2. Ren, T., Ren, J., Jia, X. & Pan, K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **74**, 562–9 (2005).
3. Yoshino, T., Aoki, A., Oda, S., Takasaki, A. A. & Mizutani, K. Long-Term Histologic Analysis of Bone Tissue Alteration and Healing Following Er : YAG Laser Irradiation Compared to Electrosurgery. *Bone* **80**, (2009).
4. Payne, J. T., Peavy, G. M., Reinisch, L. & Van Sickle, D. C. Cortical bone healing following laser osteotomy using 6.1 microm wavelength. *Lasers Surg. Med.* **29**, 38–43 (2001).
5. Cloutier, M. *et al.* Calvarial bone wound healing: a comparison between carbide and diamond drills, Er:YAG and Femtosecond lasers with or without BMP-7. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **110**, 720–8 (2010).
6. Gertzbein, S. D., Dedemeter, D., Cruickshank, B. & Kapasouri, A. The effect of laser osteotomy on bone healing. *Lasers Surg. Med.* **1**, 361–373 (1981).
7. McDavid, V. G., Cobb, C. M., Rapley, J. W., Glaros, A. G. & Spencer, P. Laser irradiation of bone: III. Long-term healing following treatment by CO2 and Nd:YAG lasers. *J. Periodontol.* **72**, 174–82 (2001).
8. Girard, B. *et al.* Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues. *Lasers Surg. Med.* **39**, 273–85 (2007).
9. Ivanenko, M. M. & Hering, P. Hard tissue ablation with a mechanically Q-switched CO2 laser. *Bone* **35**, 110–115 (1998).
10. Peavy, G. M., Reinisch, L., Payne, J. T. & Venugopalan, V. Comparison of cortical bone ablations by using infrared laser wavelengths 2.9 to 9.2 microm. *Lasers Surg. Med.* **25**, 421–34 (1999).
11. Charlton, A., Dickinson, M. R., King, T. A. & Freemont, A. J. Erbium-YAG and holmium-YAG laser ablation of bone. *Lasers Med. Sci.* **5**, 365–373 (1990).
12. Wang, X., Ishizaki, N. T., Suzuki, N., Kimura, Y. & Matsumoto, K. Morphological changes of bovine mandibular bone irradiated by Er,Cr:YSGG laser: an in vitro study. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **20**, 245–50 (2002).
13. Sasaki, K. M. *et al.* Scanning electron microscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of bone removal using Er:YAG and CO2 lasers. *J. Periodontol.* **73**, 643–52 (2002).

14. Pourzarandian, A. *et al.* Histological and TEM examination of early stages of bone healing after Er:YAG laser irradiation. *Photomed. Laser Surg.* **22**, 342–50 (2004).
15. Beltrano, J. J. *et al.* Er,Cr:YSGG Pulsed laser applied to medical dentistry. *Radiat. Eff. Defects Solids* **163**, 331–338 (2008).
16. Spencer, P. *et al.* Effective laser ablation of bone based on the absorption characteristics of water and proteins. *J. Periodontol.* **70**, 68–74 (1999).
17. Wang, X., Zhang, C. & Matsumoto, K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. *Lasers Med. Sci.* **20**, 21–7 (2005).
18. Benetti, C. *et al.* Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopic analysis of regenerated bone. in *Proc. SPIE 89264* (Choi, B. *et al.*) **8926**, 1–6 (2014).
19. Nelson, J. S., Orenstein, A., Liaw, L.-H. L. & Berns, M. W. Mid-infrared erbium:YAG laser ablation of bone: The effect of laser osteotomy on bone healing. *Lasers Surg. Med.* **9**, 362–374 (1989).
20. El Montaser, M. a, Devlin, H., Sloan, P. & Dickinson, M. R. Pattern of healing of calvarial bone in the rat following application of the erbium-YAG laser. *Lasers Surg. Med.* **21**, 255–61 (1997).
21. Mizutani, K. *et al.* Periodontal tissue healing following flap surgery using an Er:YAG laser in dogs. *Lasers Surg. Med.* **38**, 314–24 (2006).
22. De Mello, E. D. A. *et al.* Comparative histological analysis of bone healing of standardized bone defects performed with the Er:YAG laser and steel burs. *Lasers Med. Sci.* **23**, 253–60 (2008).
23. Nelson, J. S., Orenstein, A., Liaw, L.-H. L. & Berns, M. W. Mid-infrared erbium:YAG laser ablation of bone: The effect of laser osteotomy on bone healing. *Lasers Surg. Med.* **9**, 362–374 (1989).
24. Martins, G. L., Puricelli, E., Baraldi, C. E. & Ponzoni, D. Bone healing after bur and Er:YAG laser osteotomies. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **69**, 1214–20 (2011).
25. Baker, M. J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* **9**, 1771–91 (2014).
26. Lima, S. M. *et al.* Analysis of biodiesel and frying vegetable oils by means of FTIR photoacoustic spectroscopy. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **153**, 535–537 (2008).
27. Santos, M. O. *et al.* Imaging of nonlinear microscopy of burned skin treated by ultra-high intensity laser pulses. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **3**, 293–300 (2014).

28. Pereira, T. M., Zezell, D. M., Bird, B., Miljković, M. & Diem, M. The characterization of normal thyroid tissue by micro-FTIR spectroscopy. *Analyst* **138**, 7094–100 (2013).
29. Lira, L. de F. B. de *et al.* Prediction of properties of diesel/biodiesel blends by infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Fuel* **89**, 405–409 (2010).
30. Magrini, T. D., Santos, N. V. dos, Milazzotto, M. P., Cerchiaro, G. & Martinho, H. da S. Vibrational spectroscopy characterization of low level laser therapy on mammary culture cells: a micro-FTIR study. in *Proc. SPIE 7897, Opt. Interact. with Tissue Cells XXII*, (Jansen, E. D. & Thomas, R. J.) 78970T–78970T–7 (2011). doi:10.1117/12.875445
31. Wood, B. R. *et al.* Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol. Oncol.* **93**, 59–68 (2004).
32. Mordechai, S. *et al.* Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J. Microsc.* **215**, 86–91 (2004).
33. Kazarian, S. G. & Chan, K. L. a. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 858–67 (2006).
34. Sinelli, N., Casiraghi, E. & Downey, G. Studies on proofing of yeasted bread dough using near- and mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 922–31 (2008).
35. Van de Voort, F. R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.* **25**, 397–403 (1992).
36. Rabelo, J. S., Ana, P. A., Benetti, C., Valério, M. E. G. & Zezell, D. M. Changes in dental enamel oven heated or irradiated with Er,Cr:YSGG laser. Analysis by FTIR. *Laser Phys.* **20**, 871–875 (2010).
37. Benetti, C. *et al.* Detection of chemical changes in bone after irradiation with Er,Cr:YSGG. in *SPIE Vol. 7883* (Kollias, N. *et al.*) **7883**, 78834P–78834P–8 (2011).
38. Bachmann, L., Diebolder, R., Hibst, R. & Zezell, D. M. Changes in chemical composition and collagen structure of dentine tissue after erbium laser irradiation. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 2634–9 (2005).
39. Boskey, A. & Pleshko Camacho, N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* **28**, 2465–78 (2007).
40. Carden, a & Morris, M. D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J. Biomed. Opt.* **5**, 259–68 (2000).
41. Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K. & Hollinger, J. O. in *Bone Regen. Repair Biol. Clin. Appl.* (Lieberman, J. R. & Friedlaender, G. E.) 21–43 (Humana Press Inc.).

42. Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L. *Histologia e Biologia Celular (Uma Introdução à Patologia)*. 699 (Elsevier Ltd, 2012).
43. Weiner, S. & Wagner, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 271–298 (1998).
44. Miyaji, F., Kono, Y. & Suyama, Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Mater. Res. Bull.* **40**, 209–220 (2005).
45. Pleshko, N. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys. J.* **60**, 786–793 (1991).
46. Kalfas, I. H. Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus* **10**, E1 (2001).
47. Rozen, N., Lewinson, D., Bick, T., Meretyk, S. & Soudry, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **17**, 197–213 (2007).
48. Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. & Little, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 459–66 (2008).
49. Papadavid, E. & Katsambas, A. Lasers for facial rejuvenation: a review. *Int. J. Dermatol.* **42**, 480–487 (2003).
50. ALSTER, T. S. & WEST, T. B. Resurfacing of Atrophic Facial Acne Scars with a High-Energy, Pulsed Carbon Dioxide Laser. *Dermatologic Surg.* **22**, 151–155 (1996).
51. GOLDMAN, M. P. & FITZPATRICK, R. E. Laser Treatment of Scars. *Dermatologic Surg.* **21**, 685–687 (1995).
52. Farah, S. G., Azar, D. T., Gurdal, C. & Wong, J. Laser in situ keratomileusis: Literature review of a developing technique. *J. Cataract Refract. Surg.* **24**, 989–1006 (1998).
53. Stulting, R. D. *et al.* Complications of laser in situ keratomileusis for the correction of myopia. *Ophthalmology* **106**, 13–20 (1999).
54. Carvalho, F. B. *et al.* Use of laser fluorescence in dental caries diagnosis: a fluorescence x biomolecular vibrational spectroscopic comparative study. *Braz. Dent. J.* **24**, 59–63 (2013).
55. Zezell, D. M., Boari, H. G. D., Ana, P. A., Eduardo, C. D. P. & Powell, G. L. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. *Lasers Surg. Med.* **41**, 31–5 (2009).
56. Ana, P. A. *et al.* FT-Raman spectroscopic analysis of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. *Laser Phys.* **24**, 035603 (2014).

57. Martens, L. C. Laser physics and a review of laser applications in dentistry for children. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* **12**, 61–7 (2011).
58. Buchelt, M. *et al.* Er:YAG and Ho:YAG Laser Osteotomy: The Effect of Laser Ablation on Bone Healing. *Lasers Surg. Med.* **15**, 373–381 (1994).
59. Deppe, H. & Horch, H.-H. Laser applications in oral surgery and implant dentistry. *Lasers Med. Sci.* **22**, 217–21 (2007).
60. Perussi, L. R., Pavone, C., de Oliveira, G. J. P. L., Cerri, P. S. & Marcantonio, R. A. C. Effects of the Er,Cr:YSGG laser on bone and soft tissue in a rat model. *Lasers Med. Sci.* **27**, 95–102 (2012).
61. Ana, P. A., Bachmann, L. & Zezell, D. M. Lasers Effects on Enamel for Caries Prevention. *Laser Phys.* **16**, 865–875 (2006).
62. Kimura, Y. *et al.* Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J. Periodontol.* **72**, 1178–82 (2001).
63. Lewandrowski, K. U. *et al.* Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies. *Lasers Surg. Med.* **19**, 40–5 (1996).
64. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*. 1–849 (Brooks Cole, 1997).
65. Western Governors University. StudyBlue. *StudyBlue Inc.* at <<http://www.studyblue.com/notes/n/module-3-waves-and-the-electromagnetic-spectrum/deck/8054719>>
66. Griffiths, P. R. & Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 529 (Wiley, 2007).
67. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds. Infrared Spectrometry*. (Wiley, 2005).
68. Benetti, C. Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er , Cr : YSGG em tecido ósseo por espectroscopia ATR-FTIR. 119 (2010).
69. Kazarian, S. G. & Chan, K. L. A. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *Analyst* **138**, 1940–51 (2013).
70. Boskey, A. L. & Mendelsohn, R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib. Spectrosc.* **38**, 107–114 (2005).
71. Carden, A. & Morris, M. D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J. Biomed. Opt.* **5**, 259 (2000).
72. Pienkowski, D. *et al.* Calcitonin alters bone quality in beagle dogs. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 1936–43 (1997).

73. Faibish, D., Gomes, A., Boivin, G., Binderman, I. & Boskey, A. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone* **36**, 6–12 (2005).
74. Boskey, A. & Mendelsohn, R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J. Biomed. Opt.* **10**, 031102 (2005).
75. Payne, K. J. & Veis, A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers* **27**, 1749–60 (1988).
76. Paschalis, E. P. *et al.* Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1821–8 (2001).
77. Rey, C., Shimizu, M., Collins, B. & Glimcher, M. J. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the $\nu_3\text{PO}_4$ domain. *Calcif. Tissue Int.* **49**, 383–8 (1991).
78. Termine, J. D. & Posner, A. S. Infra-Red Determination of the Percentage of Crystallinity in Apatitic Calcium Phosphates. *Nature* **211**, 268–270 (1966).
79. Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P. D. & Boivin, G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J. Bone Miner. Metab.* **28**, 433–45 (2010).
80. Shemesh, A. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **54**, 2433–2438 (1990).
81. Paschalis, E. P., Betts, F., DiCarlo, E., Mendelsohn, R. & Boskey, A. L. FTIR Microspectroscopic Analysis of Normal Human Cortical and Trabecular Bone. *Calcif. Tissue Int.* **61**, 480–486 (1997).
82. Spevak, L., Flach, C. R., Hunter, T., Mendelsohn, R. & Adele Boskey. FTIR Parameters describing Acid Phosphate Substitution in Biologic Hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.* **92**, 418–428 (2013).
83. Bachmann, L. & Zezell, D. M. *Estrutura e composição do esmalte e da dentina (tratamento térmico e irradiação laser)*. 299 (Livraria da Física, 2005).
84. Benetti, C., Santos, M. O., Ana, P. A., Luciano, B. & Zezell, D. M. ATR-FTIR spectroscopy to study the effects of laser irradiation in bone tissue. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **3**, 301–305 (2014).
85. Corrêa-Afonso, A. M., Bachmann, L., de Almeida, C. G., Dibb, R. G. P. & Borsatto, M. C. Loss of structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. *Lasers Med. Sci.* (2014). doi:10.1007/s10103-014-1532-5

86. Bachmann, L., Gomes, A. S. L. & Zezell, D. M. Bound Energy of Water in Hard Dental Tissues. *Spectrosc. Lett.* **37**, 565–579 (2004).
87. Bachmann, L., Gomes, A. S. L. & Zezell, D. M. Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **62**, 1045–9 (2005).
88. Zezell, D. M. *et al.* Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. in (Rechmann, P. & Fried, D.) 75490G–75490G–12 (2010). doi:10.1117/12.842967
89. Boskey, A. & Mendelsohn, R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J. Biomed. Opt.* **10**, 031102 (2005).
90. Zezell, D. M. *et al.* Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. in (Rechmann, P. & Fried, D.) 75490G–75490G–12 (2010). doi:10.1117/12.842967
91. Kang, H. W., Oh, J. & Welch, a J. Investigations on laser hard tissue ablation under various environments. *Phys. Med. Biol.* **53**, 3381–90 (2008).
92. Eriksson, R. A. & Albrektsson, T. The effect of heat on bone regeneration: An experimental study in the rabbit using the bone growth chamber. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **42**, 705–711 (1984).
93. Nuss, R. C., Fabian, R. L., Sarkar, R. & Puliafito, C. A. Infrared laser bone ablation. *Lasers Surg. Med.* **8**, 381–391 (1988).
94. Gourion-Arsiquaud, S. *et al.* Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. *J. bone Miner. Res.* **24**, 1271–1281 (2009).
95. Bachmann, L., Baffa, O. & Zezell, D. M. Thermal degradation of dentin collagen evaluated with ESR, infrared and optical spectroscopy. *Philos. Mag.* **87**, 1033–1042 (2007).
96. Paschalis, E. P. *et al.* FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcif. Tissue Int.* **59**, 480–487 (1996).
97. Paschalis, E. P., Betts, F., DiCarlo, E., Mendelsohn, R. & Boskey, a L. FTIR microspectroscopic analysis of human iliac crest biopsies from untreated osteoporotic bone. *Calcif. Tissue Int.* **61**, 487–92 (1997).
98. Boskey, A. L., DiCarlo, E., Paschalis, E., West, P. & Mendelsohn, R. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporos. Int.* **16**, 2031–8 (2005).

99. McCreadie, B. R. *et al.* Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone* **39**, 1190–5 (2006).
100. Akkus, O., Adar, F. & Schaffler, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone* **34**, 443–53 (2004).

ANEXOS

A. Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEN

Comitê de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 108/12 - CEUA- IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"ESTUDO DO TECIDO NEOFORMADO APÓS REMOÇÃO ÓSSEA DE MANDÍBULA COM O LASER DE ER,CR:YSGG E PONTA DIAMANTADA EM ALTA ROTAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA MATR-FTIR, HISTOLOGIA E RESISTÊNCIA MECÂNICA"** de responsabilidade da pesquisadora **DRA. DENISE MARIA ZEZELL** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 22 de outubro de 2012.

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

IPEN-CEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: nnascimento@ipen.br