

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VICENTE SILVA MATTOS

Investigação da composição mineral e morfológica de tecidos dentários utilizando  
espectroscopia Raman

São Carlos  
2024



VICENTE SILVA MATTOS

Investigação da composição mineral e morfológica de tecidos dentários utilizando espectroscopia Raman

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Caiado de Castro Neto

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos  
2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mattos, Vicente Silva

Investigação da composição mineral e morfológica de tecidos dentários utilizando espectroscopia Raman / Vicente Silva Mattos; orientador Jarbas Caiado de Castro Neto - versão corrigida -- São Carlos, 2024.

83 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Raman. 2. Dentes. 3. Desmineralização. 4. Análise.  
I. Castro Neto, Jarbas Caiado de , orient. II. Título.

r

Ao longo desta jornada acadêmica, encontrei-me imerso em um mar de conhecimento, desafios e descobertas, e é com imenso orgulho e gratidão que dedico esta tese a mim mesmo. Cada página escrita é um reflexo do esforço, da resiliência e da paixão que investi neste percurso de aprendizado



## AGRADECIMENTOS

Hoje em dia nada é feito sozinho. Assim como você nunca está em uma sala vazia, nada acontece sem qualquer apoio. Tudo se faz com apoios, colaborações, feedbacks... Gostaria então de expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização desta tese, de forma direta ou indireta, que estiveram ao meu lado nesse processo.

Primeiramente, obrigado a mim mesmo, que trabalhei muito pra realizar esse projeto e fazer com que acontecesse mesmo em meio às intempéries.

Agradeço à minha querida, maravilhosa, perfeita Amanda Zangirolami, cujo apoio e incentivo foram fundamentais durante todo esse processo chamado vida, que me acompanha desde sempre. Sua perspicácia e amizade foram uma constante fonte de inspiração.

Ao Vitor Pinho (vulgo mozin) que esteve ao meu lado por estes últimos quatro anos da minha vida. A cumplicidade de nossa relação tornou cada obstáculo mais fácil de superar.

Minha família, o alicerce que sustenta todas as minhas conquistas, merece um agradecimento especial. Vocês foram minha fonte constante de apoio, amor e compreensão. A jornada não teria sido a mesma sem a presença calorosa e encorajadora de cada um de vocês. Em especial, Amanda Mattos, que me acompanha e apoia nas loucuras que nem eu mesmo me apoiaria.

Aos Henrique, Louis, Victor, Alexandre, Thiago e Leonardo, meus amigos que são homossexuais (vulgo gays), agradeço por compartilharem risos, desafios, rolês e conhecimentos ao longo dessa jornada. Sua amizade coloriu os dias cinzentos de pesquisa com vibrantes tons de diversão.

Aos amigos do ensino médio, que são as amizades mais longas da vida, que levo dentro do meu coração. Suélen, Matheus, Ana Claudia, Maikel e Rafael. Penso em vocês e nos rolês 5ª série em todos os momentos. Agradeço pela alegria, leveza e diversão que trouxeram aos momentos de pausa desse desafio acadêmico.

À Cristiane, que nos tempos de Bielefeld me deu uma perspectiva de mundo que eu jamais teria nem viajando o mundo inteiro.

Aos amigos alemães Robin, Kai, Michael, Kiril e Leslie, pelo acolhimento num mundo novo, que eu tive a oportunidade de conhecer, e me surpreendi com a amizade que me deram, que levo pro resto da vida.

Também aos amigos Shirly, Drama, Ricota, Salles, Lucas, Leo, Isis, Thales, Daniel, Sérgio, Mauro, Weliton, Sergio e Dimas. Cada um contribuiu de uma forma única na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Jarbas, que me acompanha e me aconselha desde o mestrado. Que me apoia nas ideias e sempre traz feedbacks e insights totalmente relevantes para o desenvolvimento dos meus projetos.

Ao meu orientador da Alemanha, Prof. Thomas Huser, pelo acolhimento ensinamentos e apoio durante meu estágio.

Aos colegas do LIOOA, do CEPOF e do Laboratório de Fotônica Biomolecular, que me trouxeram discussões enriquecedoras.

Agradeço à Dra. Claudia Patricia Barreira Patiño, Dr. José Dirceu Vollet Filho, Dra. Camila de Paula D'Almeida, Prof. Vanderlei Salvador Bagnato, Prof. Euclides Marega Júnior, Prof. Francisco Eduardo Gontijo Guimaraes, Prof. Fabrício Kitazono de Carvalho, Profa. Michelle Alexandra Chinelatti, Profa. Alexandra Mussolino de Queiroz, Heitor, Thais, Áyla, Kelly, Renata e Bianca, pelas parcerias e colaborações. Meu muito obrigado pela oportunidade de trabalhar em um ambiente tão estimulante e pela partilha de conhecimentos.

Também agradeço ao serviço de Biblioteca, serviço de pós-graduação do IFSC, assim como todo o corpo docente e de técnicos por fornecerem recursos e suporte indispensáveis à minha pesquisa.

Agradeço ao CNPQ, CAPES/PRINT, FAFQ e programa PAPFE da USP pelo fomento à pesquisa e auxílio na minha manutenção durante o programa de Doutorado.

Cada um de vocês contribuiu de maneira única para o desenvolvimento desta tese. A todos, meu sincero agradecimento por fazerem parte desta jornada e por tornarem possível a realização deste trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001”



*“Você nunca entra numa sala vazia”*

Autor desconhecido



## RESUMO

MATTOS, V.S. **Investigação da composição mineral e morfológica de tecidos dentários utilizando espectroscopia Raman**. 2024. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

A análise da composição mineral dos tecidos dentários desempenha um papel crescente no diagnóstico e tratamento de diversas condições odontológicas. Esse aspecto é particularmente crucial em estágios iniciais, visando prevenir o agravamento dessas condições. A espectroscopia Raman surge como uma ferramenta de investigação, fornecendo informações indicativas das alterações no conteúdo mineral das amostras, associadas à cárie dentária, erosão ácida, Hipomineralização (HMI), efeitos colaterais da radioterapia, bem como a intervenções nos tecidos. Destaca-se a utilidade desta técnica por sua natureza não invasiva e não destrutiva. Este estudo tem como objetivo a aplicação da espectroscopia Raman na análise de tecido dentário, apresentando uma metodologia específica para a análise de espectros, facilitando a detecção de modificações nos tecidos estudados (dentes). O trabalho se concentra em quatro condições modificadoras de amostras distintas. O primeiro grupo foi submetido à irradiação por laser femtossegundo, visando analisar a melhora da resistência das amostras à cárie. O segundo grupo abrange diferentes níveis de HMI. O terceiro grupo passou por sessões de radioterapia, seguidas de reirradiação, enquanto o quarto grupo foi submetido à radioterapia, diferenciando-se entre as modalidades convencional e hipofracionada. A análise espectroscópica Raman, aliada a uma metodologia específica, foi aplicada a todas as amostras, complementada pela exploração de técnicas adicionais, como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), para caracterização morfológica e mineralógica dos tecidos dentários, bem como análises de fluorescência e tomografia de coerência óptica (OCT). Os resultados obtidos destacam a capacidade distintiva da espectroscopia Raman na diferenciação entre tecidos dentários saudáveis e afetados por lesões cariosas, no monitoramento de processos de desmineralização e remineralização, e na avaliação da eficácia de tratamentos odontológicos. Este estudo reforça a posição da espectroscopia Raman como uma ferramenta essencial na caracterização de tecidos dentários e na compreensão de condições clínicas relevantes.

**Palavras-chave:** Raman. Dentes. Desmineralização. Análise.



## ABSTRACT

MATTOS, V.S. **Investigation of the mineral composition and morphological of dental tissues using Raman Spectroscopy**. 2024. 83 p. Thesis (Doctor in Sciences) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

The analysis of the mineral composition of dental tissues plays an increasing role in the diagnosis and treatment of various dental conditions. This aspect is particularly crucial in early stages to prevent the aggravation of these conditions. Raman spectroscopy emerges as an investigative tool, providing indicative information about changes in the mineral content of samples, associated with dental caries, acid erosion, Hypomineralization (HMI), side effects of radiotherapy, as well as tissue interventions. The utility of this technique stands out due to its non-invasive and non-destructive nature. This study reports the application of Raman spectroscopy in the analysis of dental tissue, presenting a specific methodology for spectral analysis, simplifying the detection of modifications in the studied tissues (teeth). The work focuses on four distinct sample-modifying conditions. The first group underwent femtosecond laser irradiation to analyze the improvement in sample resistance to dental caries. The second group encompasses different levels of HMI. The third group underwent radiotherapy sessions, followed by re-irradiation, while the fourth group underwent radiotherapy, distinguishing between conventional and hypofractionated modalities. Raman spectroscopic analysis, coupled with a specific methodology, was applied to all samples, supplemented by the exploration of additional techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) for morphological and mineralogical characterization of dental tissues, as well as fluorescence analysis and optical coherence tomography (OCT). The results obtained highlight the distinctive capability of Raman spectroscopy in differentiating between healthy dental tissues and those affected by carious lesions, monitoring processes of demineralization and remineralization, and evaluating the efficacy of dental treatments. This study reinforces the position of Raman spectroscopy as an essential tool in characterizing dental tissues and understanding relevant clinical conditions.

**Keywords:** Raman. Teeth. Demineralization. Analysis.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Representação do espalhamento da luz em moléculas. a) Espalhamento Rayleigh. b) Espalhamento Raman Stokes. c) Espalhamento Raman anti-Stokes. ....   | 24 |
| Figura 2 - Espectro Raman de dentes humanos. Espectro apresentado após processamento. ....  | 24 |
| Figura 3 - Espectrômetro Raman utilizado nas análises, composto de laser de diodo e espectrômetro. ....   | 38 |
| Figura 4 - Representação da coleta de dados realizados durante os experimentos. Os dentes eram posicionados no ponto focal do laser para a coleta das imagens. ....   | 38 |
| Figura 5 - Espectro Raman de dente sem tratamento e sem processamento, onde fica visível a curva de fluorescência sob o espectro Raman, assim como a falta de definição dos picos de interesse. ....  | 39 |
| Figura 6 - Espectro Raman de dente sem tratamento após processamento do espectro, segundo indicado. Os picos minerais ficam muito mais visíveis, sendo possível a comparação de diferentes espectros. ....  | 40 |
| Figura 7 - Espectro Raman de seis amostras após processamento pela rotina do MatLab. Algumas diferenças de intensidade de picos e área dos gráficos são perceptíveis diretamente dos espectros. ....  | 41 |
| Figura 8 - Comparação gráfica das diferenças entre as áreas de cada pico de interesse, em relação a cada amostra analisado por espalhamento Raman. ....   | 42 |
| Figura 9 - Comparação gráfica das diferenças entre as intensidades de cada pico de interesse, para cada amostra analisado por espalhamento Raman. ....  | 42 |
| Figura 10 - Comparação gráfica das diferenças entre as áreas (a) e intensidades (b) para cada amostra analisada em relação a cada pico de interesse, por espalhamento Raman. ....   | 43 |
| Figura 11 - Análise das áreas totais dos espectros. Em a) são mostrados os espectros das amostras agrupadas entre antes (azul) e após (laranja) o tratamento ácido. Em b) as áreas totais dos mesmos espectros para cada amostra antes (azul) e após (laranja) o tratamento ácido. .... | 44 |
| Figura 12 - Comparação das razões dos picos carbonato ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) e fosfato ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) nas amostras. Em a) é mostrada a razão das áreas dos picos e em b) a razão entre as intensidades. ....   | 45 |
| Figura 13 - Análise da razão carbonato/fosfato por outra forma de apresentação<br>.....   | 46 |
| Figura 14 - Comparação entre espectros dos dentes não irradiados (a) e irradiados (b) por laser femtossegundo. ....   | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 15 - Resultado da diferença entre os espectros apresentados na Figura 14. a) subtração dos espectros. b) picos de interesse e razão entre eles. ....   | 54 |
| Figura 16 - Resultado das análises por Raman para os picos em 960 cm <sup>-1</sup> (fosfato) e 1070 cm <sup>-1</sup> (carbonato) assim como a razão entre eles, indicando a diminuição desta razão para os dentes irradiados por laser femtossegundo.....                               | 55 |
| Figura 17 - Espectro Raman para amostra P1A5 indicando os espectros e cada um dos seis picos de interesse encontrado para as amostras. ....   | 56 |
| Figura 18 - Área total sob o espectro para as amostras controle sadios (hígido) e para os defeitos agrupados (geral) e para os 3 grupos de defeito 22 e 21 (HMI leve) e 3 (HMI grave). ....   | 57 |
| Figura 19 - Área dos picos analisados, em relação ao grupo controle (hígido) e os grupos com defeito, indicando o aumento destes para todos os picos analisados. ....   | 57 |
| Figura 20 - Resultado das análises por Raman para os picos em 960 cm <sup>-1</sup> (fosfato) e 1070 cm <sup>-1</sup> (carbonato) assim como a razão entre eles, indicando o aumento desta razão para os dentes com defeito (HMI). ....  | 58 |
| Figura 21 - Resultado dos espectros de fluorescência coletado para os grupos controle (hígido) e com defeito (HMI) para os lasers violeta e verde. Em a) espectros de fluorescência para os quatro grupos. b) área total dos espectros para cada grupo.....                             | 59 |
| Figura 22 - Espectros Raman para a média de cada grupo de análise. a) análise da região EC_Vest. b) análise da região EC_Lin. d) análise da região FS. e) análise da região PC. e) análise da região JAD_Vest. f) análise da região JAD_Lin.....  | 62 |
| Figura 23 - Áreas totais sob os espectros da Figura 22 para cada um dos grupos de amostras.....   | 62 |
| Figura 24 - Resultado das análises por Raman para os picos em 960 cm <sup>-1</sup> (fosfato) e 1070 cm <sup>-1</sup> (carbonato) assim como a razão entre eles. Pode-se observar o aumento desta razão para os dentes que receberam maior quantidade de radiação (picos à direita)..... | 63 |
| Figura 25 - Áreas totais dos espectros para as amostras, em relação ao esmalte (a) e na dentina (b) nas três condições: controle, convencional e hipofracionado. ....   | 65 |
| Figura 26 – Área dos picos de interesse para as regiões analisadas nas modalidades controle, tratamento convencional e tratamento hipofracionado. Em a) estão os resultados para o esmalte. b) áreas dos picos para a dentina.....  | 65 |
| Figura 27 - Análise da razão carbonato/fosfato para cada grupo de amostra nas modalidades controle, convencional e hipofracionado. Em a) áreas  |    |



dos picos e razão de áreas. b) intensidade dos picos e razão das intensidades. ....66



## SUMÁRIO

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1   | INTRODUÇÃO:JUSTIFICATIVAS E CONTEXTUALIZAÇÃO .....   | 19 |
| 2   | MOTIVAÇÕES E OBJETIVOS .....   | 21 |
| 3   | ASPECTOS FUNDAMENTAIS DO ESTUDO .....  | 23 |
| 3.1 | Espectroscopia Raman: Fundamentos e Aplicações .....   | 23 |
| 3.2 | Odontologia: Uma Perspectiva Abrangente .....  | 26 |
| 3.3 | Condições odontológicas .....  | 28 |
| 3.4 | Papel da espectroscopia Raman na quantificação do conteúdo mineral em dentes<br>31   |    |
| 3.5 | Desafios e oportunidades interdisciplinares .....  | 32 |
| 4   | REVISÃO DA LITERATURA.....   | 35 |
| 5   | METODOLOGIAS 37  |    |
| 5.1 | Projeto Raman e Irradiação por femtossegundo em dentes sadios .....  | 37 |
| 5.2 | Projeto Raman e Hipomineralização .....  | 46 |
| 5.3 | Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia .....   | 48 |
| 5.4 | Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do<br>tratamento radioterápico .....                      | 50 |
| 6   | RESULTADOS .....   | 53 |
| 6.1 | Projeto Raman e irradiação por femtossegundo em dentes sadios .....  | 53 |
| 6.2 | Projeto de investigação da Hipomineralização em dentes .....   | 56 |
| 6.3 | Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia .....   | 61 |
| 6.4 | Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do<br>tratamento radioterápico .....                      | 64 |
| 7   | DISCUSSÕES .....   | 69 |
| 7.1 | Projeto Raman e Irradiação por femtossegundo em dentes sadios .....  | 69 |
| 7.2 | Projeto de investigação da Hipomineralização em dentes .....   | 69 |
| 7.3 | Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia .....   | 70 |
| 7.4 | Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do<br>tratamento radioterápico .....                      | 70 |
| 8   | CONCLUSÕES .....   | 73 |
| 8.1 | Perspectivas Futuras.....  | 73 |
|     | REFERÊNCIAS.....   | 75 |
|     | APÊNDICE A – Funcionalização de superfícies nanoestruturadas para<br>desenvolvimento de plataformas para sensores ópticos... | 79 |

|   |    |
|---|----|
| APÊNDICE B – Localização de Anderson em cristais fotônicos naturais ..... | 81 |
| APÊNDICE C – Análise de vasos sanguíneos por OCT .....                    | 83 |

## 1 INTRODUÇÃO: JUSTIFICATIVAS E CONTEXTUALIZAÇÃO

O desenvolvimento científico se baseia tanto no desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas inovadoras na aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento, quanto na utilização de métodos muito bem conhecidos em diferentes aplicações. O trabalho do pesquisador se dá por entender como relacionar técnica e aplicação da mesma, assim como em descobrir novas possibilidades de ver os problemas e possíveis soluções para eles.

Uma jornada de formação como cientista, como doutor em ciências, se cria a partir das escolhas e decisões feitas ao longo do período, de forma a se criar, ao final do processo, um projeto que seja relevante e robusto, e que ao mesmo tempo traga um retorno à sociedade que compõe o ambiente em que essa pesquisa está inserida.

Além disso, mudanças no caminho fazem parte da formação de um pesquisador. As mudanças na direção na qual o projeto irá se encaminhar, do foco que o mesmo vai ter, e até mesmo uma possível mudança do projeto como um todo faz parte do amadurecimento da profissão como cientista. E é exatamente uma alteração no foco de pesquisa do presente trabalho se fez necessária para a conclusão desta tese de doutorado com o formato atual.

Este trabalho se formou da junção de quatro projetos (mais um piloto) desenvolvidos durante o período do doutorado. Analisando-se todos resultados obtidos nestes projetos, todos com a temática comum: a análise de tecidos dentários em diversas circunstâncias utilizando a espectroscopia Raman. Portanto, o foco desta tese se voltou para a aplicação desta técnica física para a odontologia.

Portanto este trabalho, intitulado “Investigação da composição mineral e morfológica de tecidos dentários utilizando espectroscopia Raman” se apresenta como uma forma de reunir diversos projetos desenvolvidos ao longo do período de doutorado, trazendo consigo uma visão única e geral dos mesmos. Logo, com o foco na técnica (espectroscopia Raman), a sua forma de aplicação (espectrômetro portátil) e a forma de análise aplicada voltada à uma área de interesse (odontologia) para análises diversas e objetivando a construção de uma forma robusta de análise de dentes e outros tecidos num futuro próximo.

A inovação deste projeto se dá na forma de análise dos dados, desenvolvida especialmente para os dados aqui apresentados, desenhada de forma direcionada para estas aplicações, mas com possibilidades de se aplicar em diversas outras amostras e casos não tratados nos projetos aqui apresentados.

Desta forma, esta tese se organiza primeiramente apresentando as motivações e os objetivos que dão forma a este projeto. Em seguida, são apresentadas as temáticas gerais que estão envolvidas no projeto, com detalhamento das áreas e técnicas utilizadas no seu desenvolvimento. Na seção de revisão da literatura são sumarizadas as técnicas e outras pesquisas já desenvolvidas na área, de forma a se ter uma visão geral de o que já foi feito no uso de Raman para odontologia.

Na parte da metodologia os projetos são desenvolvidos de forma individual. As amostras utilizadas são descritas para cada projeto. Também são descritas a forma como são coletados os dados por espectroscopia Raman, o processamento destes,

assim como outras técnicas utilizadas em cada trabalho. Tanto na parte de resultados quanto na de discussões é realizada a mesma abordagem por projeto, mas com a finalização das conclusões gerais observadas.

Com esta organização, deve ser possível uma identificação das características de cada projeto individualmente, assim como se ter uma visão geral das propostas apresentadas.

Os projetos aqui citados foram realizados em cooperação entre o LIOOA (Laboratório de Inovações Optrônicas para Oftalmologia e Agricultura) com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP) e Centro Universitário Central Paulista (UNICEP).

Também são adicionados quatro apêndices ao texto principal. Estes apresentam outros projetos desenvolvidos no decorrer da jornada de doutorado, indicando outras contribuições e colaborações realizadas durante o período.

## 2 MOTIVAÇÕES E OBJETIVOS

A necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias de análise de tecidos para investigar efeitos diversos em dentes se faz cada dia maior. Técnicas não destrutivas e precisas são ainda mais desejáveis, principalmente quando se tem como alvo a investigação dos tecidos *in loco*, sem a necessidade de remoção ou destruição total ou parcial dos mesmos.

Neste sentido, a espectroscopia Raman se apresenta como uma solução para a realização destas análises e também na investigação de defeitos e alterações sofridas em dentes por condições distintas. Principalmente por esta ser uma técnica não invasiva e não destrutiva, e que, com a evolução do sistema de análise, seria possível a utilização da mesma diretamente na boca de pacientes.

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho é apresentar uma metodologia de análise de dentes por espectroscopia Raman, de forma a se obter informações relevantes sobre diversas modificações propostas em dentes.

Como esta tese é formado de quatro projetos desenvolvidos individualmente, os mesmos tiveram como objetivos específicos:

- Investigar a aplicação de varredura por laser pulsado femtossegundo em dentes e investigação do efeito na redução à propensão à cárie por espectroscopia Raman;
- Analisar e distinguir defeitos em dentes afetados por Hipomineralização molar-incisivo (HMI) com espectroscopia Raman e Tomografia de Coerência Óptica (OCT);
- Investigar efeitos da desmineralização dos dentes submetidos à radioterapia, também através da espectroscopia Raman e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Investigar as diferenças entre a aplicação de radioterapia no modo convencional e hipofracionado, e verificar alterações destas modalidades nas propriedades das amostras;

De forma geral, objetificamos utilizar a espectroscopia Raman e a metodologia de análise proposta em cada uma das condições acima citadas, associando-a a outras análises.





### 3 ASPECTOS FUNDAMENTAIS DO ESTUDO

#### 3.1 Espectroscopia Raman: Fundamentos e Aplicações

##### 3.1.1 Fundamentos da espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman, uma técnica analítica avançada, investiga mudanças nos níveis vibracionais moleculares, onde fótons incidentes interagem com moléculas, resultando em mudanças energéticas. A Teoria Raman, proposta por Sir C.V. Raman, é baseada na dispersão inelástica de luz, sendo a leitura do espectro realizada por meio de deslocamentos Raman. Estes deslocamentos indicam modos vibracionais moleculares específicos, relacionando-se aos diferentes níveis vibracionais e proporcionando informações sobre a estrutura e composição únicas de cada molécula. (1-2)

Durante o processo Raman, um fóton incidente com energia  $h\nu_0$  excita eletronicamente a molécula, seguido por rápida relaxação eletrônica ao estado fundamental. Esse fenômeno envolve diferentes formas de espalhamento da luz. Inicialmente, ocorre o espalhamento elástico, conhecido como dispersão Rayleigh, onde o fóton é dispersado sem alteração em seu comprimento de onda, mantendo constante a energia do fóton antes e após a interação com a matéria. A Figura 1 apresenta um esquema representativo do espalhamento de luz em moléculas. Nas outras duas formas, observa-se o espalhamento inelástico, denominado efeito Raman. Durante esse processo, a molécula, ao retornar do estado virtual ao estado fundamental, adquire um nível energético mais alto ou mais baixo em comparação com seu estado inicial. (2-4)

Se a molécula receber energia por meio da interação com o fóton incidente ( $E = h\nu_0$ ), o fóton espalhado ( $E = h(\nu_0 - \nu_1)$ ) perderá uma porção equivalente de energia adquirida pela molécula. Esse fenômeno é conhecido como espalhamento Raman Stokes, onde o fóton espalhado possui menor energia do que o fóton incidente. (Figura 1b) No entanto, devido à distribuição de Boltzmann, que considera as condições ambientes ( $N/N_0 = e^{-(\Delta E/kT)}$ ), é possível que um número finito de moléculas já esteja vibracionalmente excitado. Nessas condições, ao interagirem com a radiação eletromagnética, essas moléculas podem perder energia, resultando no fóton espalhado adquirindo a energia dissipada pelas moléculas ( $E = h(\nu_0 + \nu_1)$ ). Esse fenômeno é caracterizado como espalhamento Raman anti-Stokes. (Figura 1c) (5-6)

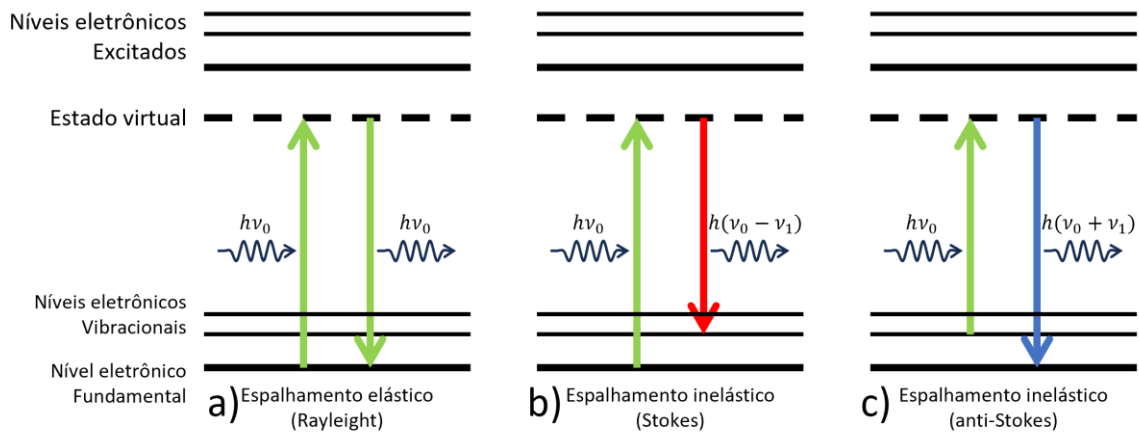


Figura 1 - Representação do espalhamento da luz em moléculas. a) Espalhamento Rayleigh. b) Espalhamento Raman Stokes. c) Espalhamento Raman anti-Stokes.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os diferentes modos vibracionais contribuem para o espectro em diferentes regiões espectrais, gerando picos distintos que refletem a impressão digital única da molécula. Os modos vibracionais representam oscilações nas ligações químicas e movimentos atômicos em uma molécula, sendo identificados pela espectroscopia Raman. Cada molécula possui um conjunto único de modos vibracionais, e a técnica é sensível a essas vibrações, permitindo a identificação e análise de diferentes compostos. A Figura 2 apresenta um espectro Raman característico de dentes, onde é possível verificar alguns picos de maior relevância, como os relacionados com o composto mineral fosfato presente ( $438\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ ) e carbonato ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ). A interpretação do espectro Raman é facilitada pela aplicação do diagrama de Jablonski, que ilustra os níveis de energia envolvidos no processo Raman, desde a excitação até a emissão de fótons dispersos. (3-4)

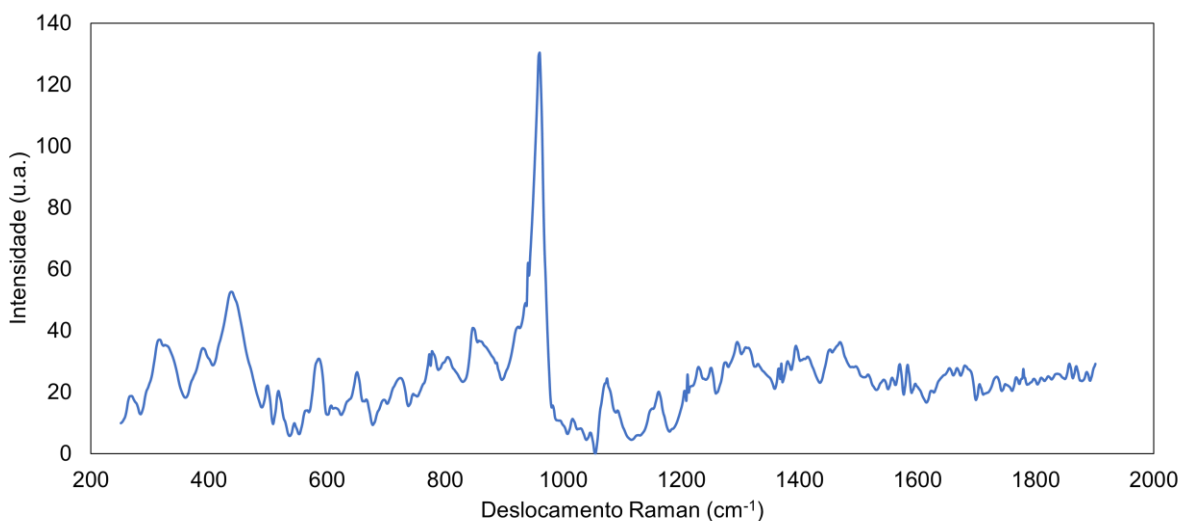


Figura 2 - Espectro Raman de dentes humanos. Espectro apresentado após processamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A energia de excitação é crítica para a eficiência do processo Raman. O uso de lasers monocromáticos de alta energia, frequentemente na faixa do ultravioleta,

maximiza a probabilidade de espalhamento inelástico. Essa compreensão detalhada dos parâmetros é essencial para otimizar a sensibilidade e resolução espectral na aplicação da Espectroscopia Raman. (3)

### **3.1.2 Instrumentação Raman**

As Configurações experimentais na espectroscopia Raman envolvem a interação da luz com a amostra. A escolha da configuração depende da natureza da amostra e dos objetivos da análise. Configurações comuns incluem espalhamento de luz de retroespalhamento (backscattering) e espalhamento de luz lateral. (5)

Os Lasers são fundamentais na espectroscopia Raman devido à necessidade de luz monocromática e intensa. Diferentes lasers são usados para diferentes aplicações, e as características do laser, como comprimento de onda e potência, afetam a sensibilidade e a resolução da técnica. Os Espectrômetros Raman são projetados para medir o deslocamento Raman da luz espalhada. Eles consistem em redes de difração ou monocromadores que dispersam a luz e detectores para registrar o espectro resultante. A escolha do espectrômetro depende dos requisitos específicos da análise. (7)

Desenvolvimentos recentes em instrumentação incluem avanços na miniaturização de espectrômetros e o uso de técnicas de imagem Raman. Técnicas avançadas de análise de dados envolvem a aplicação de aprendizado de máquina para a interpretação automatizada de espectros Raman. Aplicações emergentes incluem a utilização da espectroscopia Raman para monitorar processos em tempo real, como em reações químicas industriais, destacando o potencial contínuo da técnica para avanços inovadores em diversas áreas científicas e industriais. (8)

### **3.1.3 Análise dos dados de espalhamento Raman**

O Pré-processamento de dados é crucial para remover ruídos e melhorar a qualidade do espectro Raman. Isso inclui a correção de linha de base e a normalização dos dados para facilitar a comparação entre diferentes amostras. (8)

O Ajuste de curvas e atribuição de picos envolvem a identificação e quantificação dos picos no espectro Raman. Técnicas estatísticas e modelos matemáticos são aplicados para ajustar curvas aos picos, permitindo a determinação precisa das contribuições de diferentes modos vibracionais. A Calibração é necessária para converter os dados brutos em informações quantitativas. Isso é particularmente importante em aplicações quantitativas, onde é essencial relacionar a intensidade do sinal Raman à concentração ou outras propriedades da amostra. (8)

### **3.1.4 Aplicações da espectroscopia Raman em biologia e odontologia.**

A espectroscopia Raman encontra aplicações em diversas áreas, incluindo Química, Biologia e Materiais. Na Química, é utilizada para identificação de compostos. Na Biologia, pode ser aplicada para análise de biomoléculas, enquanto

em Materiais, é valiosa para caracterização de materiais sólidos e líquidos. As Limitações e desafios em aplicações específicas incluem a fluorescência, que pode sobrepor os sinais Raman, e a necessidade de cuidados na manipulação de amostras biológicas para evitar danos. (6,8)

A técnica tem se destacado como uma ferramenta valiosa em diversas áreas da biologia e odontologia, proporcionando insights detalhados sobre a composição molecular e a estrutura de amostras biológicas. É amplamente utilizada na identificação e análise de biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Espectroscopia Raman é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a conformação e a estrutura dessas macromoléculas, auxiliando em estudos relacionados à estrutura e função biológicas. A aplicação em células e tecidos biológicos permite a análise não invasiva de amostras, proporcionando informações sobre a composição molecular das células. Essa capacidade é valiosa em estudos relacionados a doenças, diferenciação celular e monitoramento de processos biológicos. (9-11)

A análise de tecidos dentários, como esmalte, dentina e cimento, é uma aplicação importante da espectroscopia Raman em odontologia. Ela permite a identificação e quantificação de componentes específicos, auxiliando no entendimento da composição mineral e orgânica dos tecidos dentários. A técnica também é utilizada para monitorar tratamentos dentários, como remineralização e desmineralização do esmalte. Isso é vital para avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas e entender as mudanças na estrutura dos tecidos dentários ao longo do tempo. Além disso, tem potencial para identificar e caracterizar patógenos bucais, contribuindo para o diagnóstico precoce de doenças periodontais e outras condições bucais. A capacidade de análise em tempo real torna essa técnica atraente para uso clínico. Na odontologia restauradora, a espectroscopia Raman é empregada no estudo de materiais dentários, como resinas compostas e cerâmicas. Isso é crucial para garantir a qualidade e a durabilidade desses materiais utilizados em restaurações dentárias. (10-11)

Em resumo, a espectroscopia Raman desempenha um papel significativo em proporcionar informações moleculares detalhadas em contextos biológicos e odontológicos. Seu potencial diagnóstico, capacidade de monitoramento em tempo real e aplicação não invasiva tornam-na uma ferramenta valiosa para pesquisas e aplicações clínicas nessas áreas. (9)

### **3.2 Odontologia: Uma Perspectiva Abrangente**

A odontologia vai além da simples prática clínica e da restauração dentária, abrangendo uma ampla gama de disciplinas interconectadas. Sendo um campo complexo, são necessárias abordagens dos aspectos clínicos, mas também a pesquisa e a inovação que moldam a odontologia contemporânea. Desde as raízes históricas até as modernas abordagens multidisciplinares, essa introdução busca contextualizar a odontologia como um campo dinâmico que evolui continuamente para enfrentar os desafios da saúde bucal. Além disso, a análise crítica das tendências

emergentes e das lacunas no conhecimento atual serve como um alicerce para a pesquisa que será apresentada, reforçando a importância de uma visão abrangente e atualizada do campo odontológico.

### **3.2.1 Importância da análise dentária para a saúde bucal.**

A análise dentária desempenha um papel fundamental na promoção da saúde bucal, indo além da simples detecção de cáries e restaurações. Sabemos da importância da análise detalhada dos tecidos dentários para a compreensão holística da saúde bucal. Abordagens que vão desde a anatomia e morfologia dentária até a avaliação de alterações microestruturais são cruciais para o diagnóstico precoce de condições patológicas e o desenvolvimento de estratégias preventivas. Além disso, a relação entre a saúde bucal e a saúde geral do paciente é explorada, evidenciando como a análise dentária pode fornecer insights valiosos sobre condições sistêmicas. Buscamos nos aprofundar nesses aspectos, destacando as contribuições específicas da espectroscopia Raman na análise precisa e não invasiva dos tecidos dentários, ampliando as fronteiras do conhecimento na interface entre odontologia e tecnologias analíticas de ponta.

### **3.2.2 Interseção da odontologia com a física e análise de tecidos.**

A convergência entre odontologia, física e análise de tecidos constitui um domínio de pesquisa vibrante e inovador, alimentado pela fusão de princípios fundamentais da física com as demandas complexas da odontologia contemporânea. Nesse contexto, a espectroscopia Raman emerge como uma ferramenta central, incorporando conceitos físicos avançados para aprofundar a compreensão e a análise dos tecidos dentários. (9)

A aplicação de fenômenos físicos, como o espalhamento inelástico de luz, desvela camadas anteriormente inexploradas de informações, proporcionando uma visão mais nítida da composição molecular dos tecidos. Essas abordagens não apenas enriquecem a compreensão das características estruturais, mas também oferecem métodos não destrutivos e precisos para a caracterização dos tecidos dentários. (9)

Este elo entre disciplinas aparentemente distintas visa transcender as fronteiras tradicionais, destacando o potencial transformador da física na prática clínica odontológica. Ao introduzir técnicas avançadas de análise de tecidos ancoradas nos princípios da física, almejamos não apenas otimizar diagnósticos clínicos, mas também impulsionar descobertas inovadoras para uma compreensão mais profunda das condições orais. Este encontro entre odontologia e física representa uma promissora fronteira de pesquisa que pode catalisar avanços significativos e melhorias substanciais na abordagem e tratamento das condições bucais. (9)

### **3.3 Condições odontológicas**

#### **3.3.1 Modificações químicas e morfológicas de dentes irradiados por laser femtossegundo**

A interação de dentes com lasers de femtossegundo representa uma área de pesquisa inovadora na odontologia, oferecendo perspectivas interessantes sobre modificações químicas e morfológicas dessas estruturas biomineralizadas. Os pulsos ultracurtos dos lasers de femtossegundo permitem uma interação altamente controlada e precisa com os tecidos dentários, levando a modificações específicas nas propriedades dos dentes. Em nível químico, a interação laser-dente pode resultar em alterações na composição mineral dos tecidos dentários, afetando principalmente o esmalte e a dentina. A formação de novas fases minerais e a reorganização cristalina são fenômenos observados, indicando uma potencial melhoria na resistência à desmineralização e à cárie. No entanto, a compreensão aprofundada dos mecanismos subjacentes a essas alterações químicas é essencial para orientar aplicações clínicas eficazes e seguras. (12-13)

Além das modificações químicas, os lasers de femtossegundo também influenciam a morfologia dos dentes. A precisão na remoção de tecido dental, devido à fotodisrupção altamente controlada, permite a realização de procedimentos minimamente invasivos. A capacidade de realizar ablação seletiva, preservando as estruturas adjacentes, torna os lasers de femtossegundo uma ferramenta promissora para a preparação de cavidades e procedimentos restauradores. Entretanto, é crucial abordar as implicações dessas modificações morfológicas na propensão a cáries. A criação de superfícies mais homogêneas e resistentes pode reduzir a suscetibilidade dos dentes às lesões cariosas, mas também é importante considerar o impacto a longo prazo dessas alterações na saúde bucal. Assim, a pesquisa nesse campo visa equilibrar os benefícios terapêuticos das interações laser-dente com a preservação das propriedades naturais que garantem a resistência dos dentes às condições cariosas. (12,14)

#### **3.3.2 Investigação da Hipomineralização em dentes**

A Hipomineralização Dentária (HMI) é uma condição que afeta a formação do esmalte dentário durante o desenvolvimento dentário. Este problema resulta em uma matriz de esmalte mais porosa e menos mineralizada do que o normal, levando a uma maior suscetibilidade a cáries e sensibilidade dentária. A composição mineral dos dentes é afetada principalmente pelo comprometimento na incorporação de minerais, como o cálcio e o fósforo, durante a mineralização. As crianças que apresentam HMI dentária frequentemente enfrentam desafios significativos, como dor durante a mastigação e sensibilidade extrema a alimentos e bebidas quentes e frios. A dor associada a essa condição pode ter um impacto significativo na qualidade de vida das crianças afetadas, influenciando seus hábitos alimentares e rotinas de higiene bucal. (15-18)

A identificação da HMI dentária é essencial para fornecer tratamento adequado e melhorar a qualidade de vida do paciente. As características clínicas incluem manchas ou opacidades no esmalte, geralmente em molares e incisivos permanentes. A gravidade pode variar, desde casos leves até formas mais severas que exigem intervenções odontológicas imediatas. O tratamento pode envolver a aplicação de agentes remineralizantes, selantes, e, em casos mais graves, restaurações dentárias. A abordagem do tratamento deve ser personalizada, considerando a extensão da HMI e as necessidades específicas de cada paciente. (17-18)

No contexto da investigação da HMI dentária, técnicas avançadas, como a espectroscopia Raman, apresentam potencial significativo. A espectroscopia Raman pode ser empregada para analisar a composição mineral dos dentes, fornecendo informações detalhadas sobre a estrutura cristalina e as alterações na matriz mineral. A detecção de variações sutis na composição mineral, característica da HMI, pode ser realizada de maneira não invasiva, possibilitando uma identificação precoce e precisa dessa condição. A aplicação da espectroscopia Raman poderia, assim, fornecer uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e acompanhamento da HMI dentária, permitindo uma intervenção mais eficaz e personalizada para pessoas afetadas por essa condição. (18-19)

### **3.3.2.1 Associação de técnicas para o diagnóstico da HMI**

Uma caracterização mais abrangente e detalhada da Hipomineralização Dentária pode ser feita com a associação de diferentes técnicas, como as Espectroscopias Raman e de Fluorescência com Tomografia de Coerência Óptica (OCT). A técnica de OCT é uma técnica de imagem que utiliza feixes de luz para obter imagens em alta resolução das estruturas internas de materiais biológicos, incluindo os tecidos dentários. Através da captura de imagens transversais das camadas do dente, a OCT oferece informações detalhadas sobre a estrutura e a densidade dos tecidos. (20)

Na caracterização da HMI, a OCT pode ser particularmente benéfica devido à sua capacidade de visualizar alterações estruturais no esmalte e na dentina em nível micrométrico. A HMI frequentemente resulta em alterações morfológicas e na porosidade da estrutura dentária, características que podem ser identificadas e quantificadas pela OCT. A complementaridade entre a espectroscopia Raman, que fornece informações sobre a composição mineral, e a OCT, que destaca as características estruturais, oferece uma abordagem abrangente para a caracterização da HMI. Enquanto a espectroscopia Raman destaca as variações na mineralização, a OCT pode fornecer imagens detalhadas da morfologia dentária, permitindo um diagnóstico mais completo e preciso da HMI. Essa abordagem integrada tem o potencial de melhorar a compreensão da extensão da HMI e facilitar a seleção de estratégias de tratamento personalizadas. (19-20)

### **3.3.3 Verificação de modificações morfológicas nas estruturas dentárias devido à irradiação por radioterapia**

A investigação da variação da composição mineral dos dentes em pacientes submetidos a radioterapia para o tratamento de câncer de cabeça e esôfago é um campo crítico que destaca os efeitos impactantes dessa terapia na saúde bucal. A radioterapia, embora seja eficaz no combate a células cancerígenas, pode provocar alterações significativas na composição mineral e morfologia dos dentes desses pacientes. A exposição à radiação ionizante pode resultar na depleção de minerais essenciais, como o cálcio, comprometendo a estrutura e a integridade dos tecidos dentários. (21-22)

A radioterapia frequentemente induz a desmineralização do esmalte dentário e a diminuição da produção de saliva, levando à chamada "cárie de radiação". A saliva desempenha um papel crucial na manutenção da saúde bucal, ajudando na remineralização dos dentes e na proteção contra cáries. A redução da produção salivar associada à radioterapia torna os dentes mais suscetíveis à desmineralização, resultando em cáries mais agressivas e difíceis de controlar. Além disso, a radioterapia pode comprometer a vascularização e a regeneração dos tecidos, impactando adversamente a morfologia dentária. (21)

Essas alterações na composição mineral e morfologia dos dentes representam desafios significativos na vida dos pacientes com câncer de cabeça e esôfago. A dor associada à cárie de radiação, a sensibilidade dentária e a dificuldade na mastigação e na fala são efeitos adversos comuns que afetam a qualidade de vida desses pacientes. Adicionalmente, as alterações estruturais podem dificultar a adaptação de próteses dentárias, intensificando os desafios na reabilitação oral desses indivíduos. (21,23)

A pesquisa nesse campo é crucial para entender os mecanismos específicos pelos quais a radioterapia afeta a saúde bucal e para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento personalizadas. A implementação de protocolos odontológicos preventivos antes do início da radioterapia, bem como o acompanhamento próximo durante e após o tratamento, são fundamentais para minimizar os efeitos adversos nos dentes desses pacientes e melhorar sua qualidade de vida bucal pós-tratamento. O uso de técnicas avançadas, como a espectroscopia Raman, pode proporcionar insights detalhados sobre as mudanças na composição mineral, permitindo uma abordagem mais precisa e personalizada no cuidado odontológico desses pacientes. Essa pesquisa não apenas aborda as implicações clínicas, mas também destaca a importância de uma abordagem multidisciplinar para otimizar a saúde bucal e a qualidade de vida global de pacientes submetidos à radioterapia para câncer de cabeça e esôfago. (23-24)



### **3.3.4 Dentes permanentes após modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico**

A análise em dentes permanentes após a modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico é uma área de pesquisa crucial, considerando os efeitos específicos dessa abordagem na saúde bucal dos pacientes. A radioterapia hipofracionada, que envolve a entrega de doses mais elevadas por fração, apresenta desafios adicionais em termos de impacto nos tecidos dentários permanentes. Esta modalidade tem sido associada a alterações significativas na composição mineral e morfologia dos dentes, com implicações substanciais para a saúde bucal a longo prazo. (22)

A exposição a doses mais elevadas de radiação pode resultar em danos mais acentuados à estrutura mineral dos dentes permanentes. A desmineralização do esmalte, a diminuição da densidade mineral e a comprometimento da integridade dos tecidos dentários são observados com maior frequência em pacientes submetidos à radioterapia hipofracionada. Essas alterações podem predispor os dentes a condições adversas, como cárie de radiação, devido à redução na capacidade de remineralização natural. (23-25)

A análise aprofundada dos dentes permanentes após a modalidade hipofracionada da radioterapia também revela efeitos morfológicos notáveis. A perda de estrutura e a quebra da integridade do esmalte são frequentemente observadas, afetando não apenas a estética dentária, mas também a função mastigatória. A susceptibilidade aumentada à cárie de radiação nessas condições morfológicas adversas destaca a necessidade de estratégias preventivas e intervenções odontológicas específicas para pacientes submetidos a esse tipo de tratamento radioterápico. (21,23-25)

O acompanhamento clínico pós-tratamento é fundamental para avaliar o impacto a longo prazo da radioterapia hipofracionada nos dentes permanentes. Protocolos odontológicos personalizados, como monitoramento frequente, aplicação de agentes remineralizantes e cuidados preventivos específicos, são essenciais para minimizar os efeitos adversos e promover a saúde bucal contínua desses pacientes. O uso de técnicas avançadas de análise, incluindo a espectroscopia Raman, pode ser especialmente valioso para uma avaliação mais detalhada da composição mineral residual nos dentes permanentes e orientar estratégias de tratamento mais direcionadas. Essa abordagem integrada entre a prática clínica e a pesquisa científica é essencial para otimizar os cuidados odontológicos pós-radioterapia hipofracionada e melhorar a qualidade de vida bucal dos pacientes. (10,21,25)

### **3.4 Papel da espectroscopia Raman na quantificação do conteúdo mineral em dentes**

A avaliação precisa da composição mineral dos tecidos dentários desempenha um papel crucial na compreensão de condições dentais, como cárie e erosão. Aqui verificamos o papel da espectroscopia Raman na quantificação do conteúdo mineral

em dentes afetados por diferentes condições. Aprofundando-se na resposta espectral dos minerais presentes no esmalte e na dentina, minha pesquisa visa identificar variações sutis na composição mineral que podem servir como marcadores sensíveis para diagnóstico precoce e monitoramento de progressão de doenças dentais. Ao abordar as nuances das alterações minerais em diferentes estágios das condições dentais, esta seção contribui para o desenvolvimento de ferramentas analíticas avançadas no campo da odontologia. (8-11)

A obtenção de dados espectroscópicos confiáveis é essencial para uma análise precisa dos tecidos dentários. Se faz necessário explorar métodos de coleta de dados espectroscópicos com a espectroscopia Raman aplicada à odontologia. Isso inclui técnicas de mapeamento espacial para avaliar a heterogeneidade mineral em uma superfície dental, bem como a otimização de parâmetros experimentais, como tempo de exposição e resolução espectral. A compreensão detalhada desses métodos é crucial para interpretar corretamente os espectros Raman obtidos e extrair informações valiosas sobre a mineralização dental. A discussão aprofundada destes métodos contribuirá para o avanço das práticas experimentais na área. (4,9)

Entre as vantagens associadas à análise de tecidos dentários por meio da espectroscopia Raman, destaca-se a capacidade não invasiva e in situ de obter informações moleculares, o que permite diagnósticos em tempo real e monitoramento longitudinal. No entanto, é imperativo abordar as limitações, como a suscetibilidade à fluorescência, que pode interferir nos sinais Raman. A compreensão profunda dessas considerações é vital para orientar a aplicação eficaz da espectroscopia Raman na análise de tecidos dentários, proporcionando uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias de pesquisa e aplicação clínica. (3,8,11)

### **3.5 Desafios e oportunidades interdisciplinares**

A aplicação da espectroscopia Raman na análise de dentes representa uma abordagem inovadora e promissora, no entanto, não está isenta de desafios e oportunidades interdisciplinares. Um dos desafios centrais reside na complexidade dos tecidos dentários e nas condições variáveis encontradas na prática clínica. A presença de fluorescência, por exemplo, pode obscurecer os sinais Raman, exigindo estratégias avançadas de supressão de fundo. Além disso, a necessidade de adaptação de métodos experimentais para situações clínicas reais, incluindo a integração com sistemas odontológicos convencionais, é uma consideração crucial. A interdisciplinaridade entre física, odontologia e engenharia é fundamental para superar esses desafios, promovendo uma colaboração eficaz na otimização de técnicas experimentais e na interpretação de dados espectroscópicos complexos. (3,8)

No entanto, esses desafios também se entrelaçam com oportunidades significativas. A espectroscopia Raman oferece a capacidade única de fornecer informações moleculares específicas sobre os tecidos dentários em tempo real, permitindo um diagnóstico preciso e monitoramento contínuo durante tratamentos odontológicos. A possibilidade de avaliar a mineralização em diferentes estágios de condições dentais cria oportunidades para intervenções terapêuticas personalizadas

e mais eficazes. A interdisciplinaridade emerge como um ponto focal para explorar totalmente essas oportunidades, incentivando a troca de conhecimentos entre pesquisadores, clínicos e engenheiros para impulsionar avanços na aplicação clínica da espectroscopia Raman na odontologia. Essa abordagem colaborativa não apenas aborda desafios técnicos, mas também estimula a inovação, proporcionando um terreno fértil para a evolução das práticas diagnósticas e terapêuticas no campo odontológico. (3,8-10)



#### 4 REVISÃO DA LITERATURA

A espectroscopia Raman é utilizada em diversas áreas, desde o seu desenvolvimento e aprimoração como técnica. Dentre as diversas aplicações, algumas podem ser destacadas.

Por exemplo, usando a espectroscopia Raman, Bulatov *et al.* (26) realizaram uma comparação entre dentes saudáveis e cariados, constatando que o processo de cárie pode afetar as fases de fosfato e carbonato do esmalte. Neste estudo, foram identificadas quatro fases de cárie dentária, de acordo com sua gravidade: esmalte normal (sem cárie), cárie de fissura, cárie moderada e cárie avançada. Os resultados de suas análises forneceram informações sobre diversas ligações químicas e modos vibracionais potencialmente afetados pela cárie. Concluiu-se que a emissão em  $960\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento de fosfato, é a mais significativa e pode ser utilizada para a detecção de cáries. (26)

Fraser *et al.* (27) realizaram um mapeamento químico das lesões associadas à hipomineralização molar-incisiva em dentes humanos. Medidas com espalhamento Raman foram realizadas por meio de um microscópio Raman Senterra (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha) equipado com lasers de 532 nm e 785 nm. Espectros Raman de espécimes seccionados foram coletados em um formato de grade para mapear quimicamente os componentes Raman ativos nas lesões hipomineralizadas com diferentes graus de gravidade, descritos como branco, amarelo ou marrom. Essas lesões de cárie foram mapeadas usando razões integrais das bandas dos principais componentes (hidroxiapatita e carbonato do tipo B) e valores de escores da análise de componentes principais. As lesões estudadas apresentaram níveis reduzidos de mineral em comparação com o esmalte saudável, e essas variações foram consistentes com um aumento da desordem no componente mineral das lesões dentárias hipomineralizadas. Os resultados revelaram que as lesões de esmalte hipomineralizado contêm níveis reduzidos de hidroxiapatita e/ou ligeiramente maiores de componentes orgânicos em comparação com o esmalte saudável normal. (27)

Kuramochi *et al.* (28) conduziram um estudo por meio de microespectroscopia Raman e técnicas de microrradiografia transversal para investigar a influência do uso de bicarbonato nos efeitos dos íons de carbonato na fase mineral durante a desmineralização (teste de resistência ácida) de lesões subsuperficiais. Lesões iniciais foram formadas por desmineralização do esmalte bovino, e espécimes foram expostos a soluções de remineralização contendo 0, 5 ou 50 mm de bicarbonato. Em uma etapa posterior, testes de resistência ácida foram realizados em amostras de esmalte remineralizado e saudável. Os espécimes dentários foram analisados por microespectroscopia Raman a laser confocal (sistema de microespectroscopia Raman dispersiva Nicolet Almega XR; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com um laser de 780 nm e uma grade de 360 linhas por mm. Os espectros foram adquiridos em seis pontos na superfície cortada de cada amostra, a 10 e 40  $\mu\text{m}$  da superfície na direção da lesão, aplicando uma abertura de 100  $\mu\text{m}$  para delimitar as áreas da superfície e do corpo da lesão. A relação sinal-ruído foi melhorada, com redução do fundo de fluorescência, realizando constantemente 10 exposições

consecutivas para todas as amostras, cada uma com duração de 10 s, com filtro de densidade neutra de 10%. As intensidades dos picos de fosfato ( $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ) e substituição de carbonato do tipo B ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) foram medidas. Os espectros Raman obtidos revelaram que íons de carbonato e fosfato foram eficientemente incorporados em ambas as camadas superficiais e corpos de lesões durante a remineralização após a aplicação de bicarbonato. Embora a média dos perfis minerais medidos do esmalte remineralizado diferisse dos do esmalte saudável após os testes de resistência ácida, constatou-se que a aplicação de fosfato e bicarbonato e sua consequente integração nas lesões subsuperficiais de esmalte não alteraram os níveis gerais de mineralização durante o processo de remineralização. (28)

Braga *et al.* (29) conduziram um estudo utilizando Espectroscopia FT-Raman para examinar o potencial erosivo de duas soluções ácidas. Este estudo avaliou e comparou *in vitro* a estrutura e os componentes minerais do esmalte dental após submetido a tratamento erosivo no suco gástrico originado do exame de endoscopia e no suco de laranja disponível comercialmente (Minute Maid, Coca-Cola Company, pH 3.7, acidez titulável 0.65 mL) da seguinte maneira: 5 minutos em 3 mL de solução desmineralizante, enxaguado com água destilada e armazenado em saliva artificial por 3 horas. Esse ciclo foi repetido quatro vezes ao dia, por 14 dias consecutivos. A comparação da razão carbonato/fosfato (bandas em  $1072\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) mostrou que o suco gástrico tem um potencial erosivo maior e causou alterações mais significativas na morfologia e composição mineral do esmalte dental do que o suco de laranja. Fotomicrografias SEM da superfície do esmalte após o desafio erosivo com suco gástrico mostraram um padrão específico único, com escavação dos centros dos prismas e regiões periféricas relativamente intactas, refletindo uma aparência de favo de mel. Por outro lado, a superfície do esmalte após o suco de laranja revelou um desgaste generalizado da superfície sem evidência aparente de um padrão de prismas, e a superfície não foi completamente atacada. (29)

Esses resultados destacam a importância e a versatilidade das técnicas de espectroscopia Raman e microscopia confocal Raman na caracterização, monitoramento e avaliação de tecidos dentários, bem como no desenvolvimento e avaliação de tratamentos odontológicos.

## 5 METODOLOGIAS

### 5.1 Projeto Raman e Irradiação por femtossegundo em dentes sadios

#### 5.1.1 Descrição e preparação das amostras

Para este projeto foram analisados 30 dentes bovinos. Cada amostra foi cortada em regiões de 5x5 mm cada, apenas com a região do esmalte exposta para as análises. Todas foram limpas com banho ultrassônico e armazenados em Solução Thymol 0,01% para evitar a proliferação de fungos e refrigerados.

A única preparação realizada nos dentes foi o polimento da superfície do esmalte com lixas de silicone e pastas de diamante. As amostras foram separadas em dois grupos de 15 unidades em cada, uma para receber o tratamento por laser femtossegundo e o segundo para controle, sem qualquer tratamento.

O processo de coleta e preparação das amostras foi realizado com auxílio da Dra. Michelle Chinelatti e Heitor Hussni Casarin.

#### 5.1.2 Irradiação por laser pulsado femtossegundo

Cada uma das amostras foi irradiada por laser pulsado femtossegundo (Laser Libra Ti:Saphira da Coherent) com frequência de 1 kHz, com largura de banda de 785 nm à 815 nm e potência de 450 mW. Os parâmetros de marcação foram ajustados pelo software EZCAD, para determinação das formas, velocidade de varredura, assim como da quantidade de pulsos por região da amostra.

Foi realizado um teste de marcação nos dentes para verificar a marcação em cada amostra e determinar os parâmetros que apresentaram maiores modificações visíveis sobre a superfície dos dentes.

Os parâmetros de marcação testados para verificação de mudanças na superfície do esmalte dos dentes foram: (30)

- Velocidade de marcação: 1 e 10 mm/s
- Distanciamento entre linhas consecutivas: 0,0001 e 0,001 mm

Foram utilizadas três amostras para verificação dos parâmetros que causassem maiores mudanças na superfície dos dentes. As amostras foram:

- Dente 1: irradiado a 1mm/s e distanciamento de 0,0001mm;
- Dente 2: irradiado a 1mm/s e distanciamento de 0,001mm;
- Dente 3: irradiado a 10mm/s e distanciamento de 0,001mm;

A partir das análises destas amostras foram definidos os parâmetros que causassem maior modificação na superfície do esmalte.

### 5.1.3 Coleta de dados por espectroscopia Raman

A coleta de dados por espectroscopia Raman foi realizada utilizando um espectrômetro Raman portátil da Ocean Optics (Inc., Dunedin, FL, USA), usando laser de diodo para excitação em  $\lambda=785$  nm e resolução espectral de  $11\text{cm}^{-1}$ . As medidas foram feitas com excitação na potência de 400mW, 5 segundos de aquisição e 3 aquisições, com o espectro final sendo a média de cada uma destas três medidas. A Figura 3 apresenta o espectrômetro Raman utilizado nos experimentos.

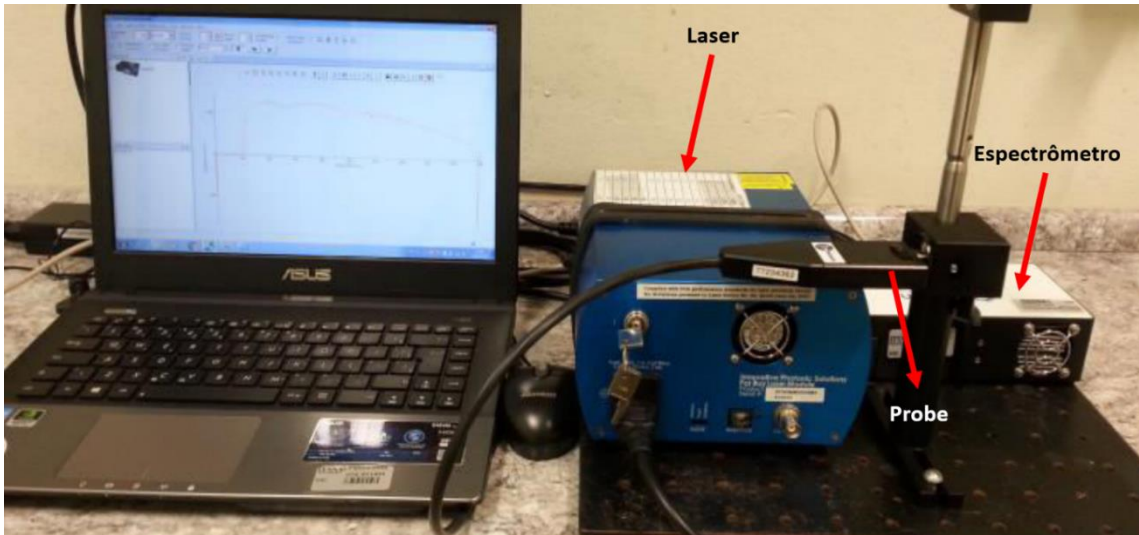


Figura 3 - Espectrômetro Raman utilizado nas análises, composto de laser de diodo e espectrômetro.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

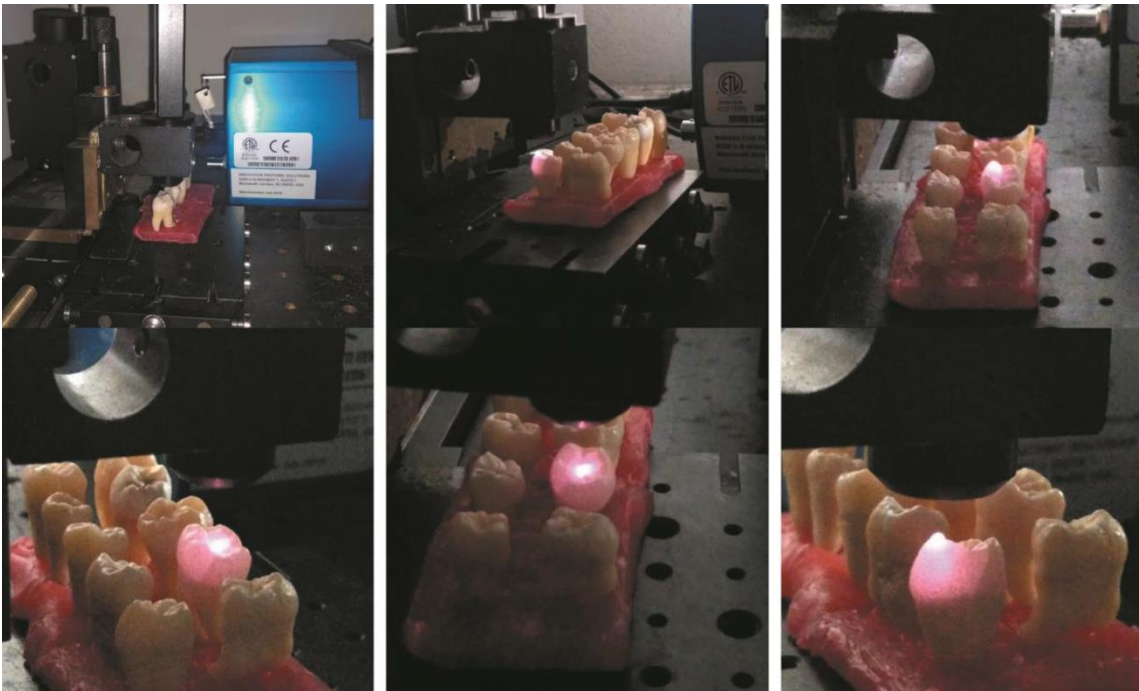


Figura 4 - Representação da coleta de dados realizados durante os experimentos. Os dentes eram posicionados no ponto focal do laser para a coleta das imagens.  
Fonte: Adaptada de SANTOS (31)



Podemos ver na Figura 4 como as amostras eram posicionados sob a probe para análise por Raman. Cada amostra era inserida na posição apropriada para análise da região de interesse. Era então feito o ajuste da distância focal e então coleta dos espectros.

Foi feita a coleta de espectros em região única em cada uma das amostras, sendo uma na região não irradiada por laser femtossegundo (NI) e uma região irradiada (IRR). As superfícies dos dentes eram homogêneas, portanto, foi apenas selecionada a região com ou sem a irradiação por laser para realização da análise.

A Figura 5 indica um espectro Raman característico, obtido após a coleta de dados pelo espectrômetro sem qualquer tratamento. Nela, podemos já notar o pico referente ao fosfato ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) bastante visível, assim como outros de menor intensidade.

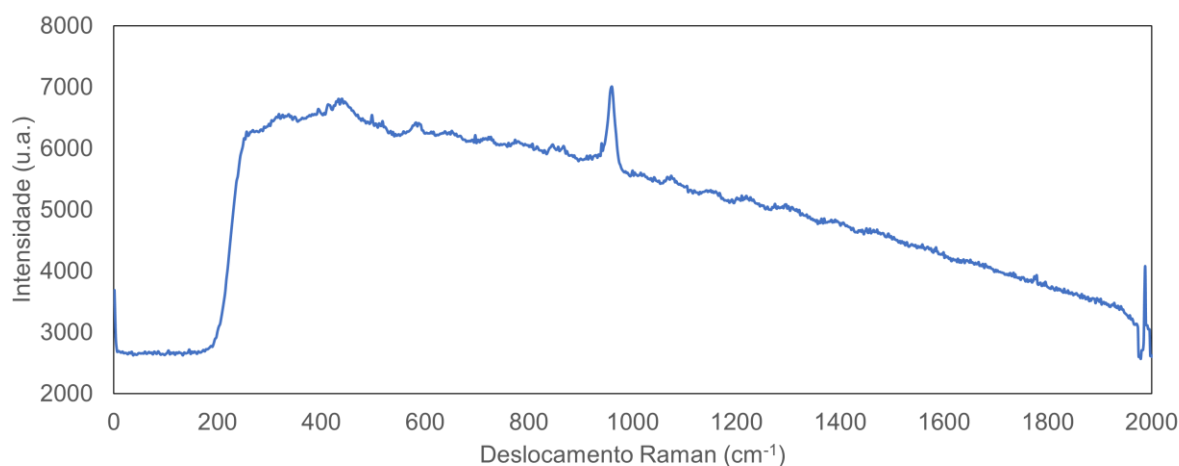


Figura 5 - Espectro Raman de dente sem tratamento e sem processamento, onde fica visível a curva de fluorescência sob o espectro Raman, assim como a falta de definição dos picos de interesse.

Fonte: Elaborada pelo Autor.

#### 5.1.4 Processamento dos espectros

As análises dos espectros Raman foram realizadas em duas etapas.

Primeiramente, os espectros foram tratados utilizando uma rotina escrita em MATLAB (The MathWorks, Inc.), cujos objetivos eram a retirada da curva de base mais intensas, devido à autofluorescência dos tecidos analisados assim como a redução de ruídos devido ao uso do equipamento portátil. Além disso, a rotina foi responsável pela identificação dos picos de interesse, assim como determinar a intensidade e a área sob a Lorentziana plotada para cada um dos picos.

De forma geral, as etapas realizadas foram:

- 1- Remoção de ruídos para suavização da curva;
- 2- Remoção de curva de base com uso de polinomial de ordem seis;
- 3- Remoção de oscilações de segunda ordem no interior das curvas;
- 4- Definição dos picos de interesse (indicados pelo usuário);
- 5- Plotar a Lorentziana com máximo no pico de interesse;

- 6- Cálculo da área de cada pico de interesse;
- 7- Cálculo da intensidade de cada pico de interesse;
- 8- Cálculo da área total do espectro.

A rotina foi rodada para cada amostra, gerando um espectro com redução de ruídos, com os picos de interesse destacados. Os picos de interesse selecionados para análise foram: (32-34)

- $438\text{ cm}^{-1}$  – Pico relacionado ao Fosfato
- $582\text{ cm}^{-1}$  – Modos Vibracionais  $v_1$ ,  $v_3$  e  $v_4$  ( $PO_3$ )<sup>4-</sup> na hidroxiapatita
- $960\text{ cm}^{-1}$  – Alongamento vibracional simétrica dos íons fosfato ( $PO_4^{3-}$ )
- $1070\text{ cm}^{-1}$  – Pico do carbonato

Também foi analisada a relação carbonato fosfato, dada pela relação entre os picos  $1070\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ . Esta relação é significativa para a relação de propensão a cáries devido à alteração da proporção dos minerais nos tecidos.

A Figura 6 mostra o espectro de um dente sem receber tratamento após o processamento da curva pela rotina. Nesta podemos ver que a curva de fluorescência foi removida, tendo-se um espectro mais linear, a quantidade de ruídos foi reduzida e os picos de interesse estão destacados através de uma Lorentziana. A rotina fornece ao final do processo as informações para a plotagem do espectro e das Lorentzianas, assim como a intensidade das mesmas, área delas e também a área total do espectro.

Todos os espectros passaram pelo mesmo processamento, e não foi feita normalização dos mesmos.

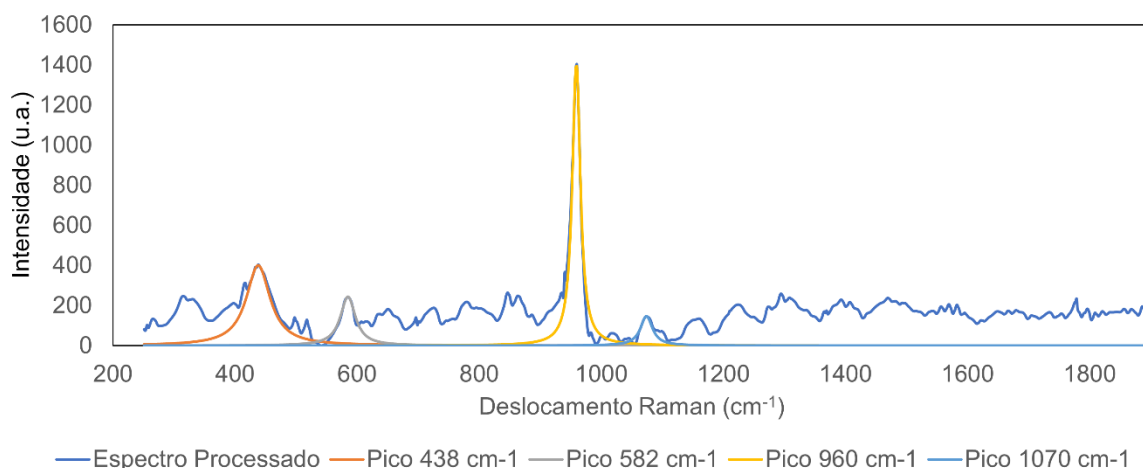


Figura 6 - Espectro Raman de dente sem tratamento após processamento do espectro, segundo indicado. Os picos minerais ficam muito mais visíveis, sendo possível a comparação de diferentes espectros.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.1.5 Análises performadas

Conforme detalhado na seção 5.1.4, foram adquiridas diversas informações para cada espectro, incluindo o espectro processado, as Lorentzianas associadas a cada pico de interesse, a área correspondente a cada Lorentziana, a intensidade de

cada Lorentziana e a área total do espectro. A partir dessas informações, realizaram-se diversas correlações e interações entre os dados obtidos.

Nesta seção será utilizado, para exemplificar os métodos de análise realizados, um grupo de seis amostras de um piloto para exemplificação da técnica. Este conjunto representa 3 dentes bovinos inteiros limpos e lixados para exposição do esmalte dentário. Estão separados em dois grupos, o grupo controle e o grupo ácido. A diferença entre ambos é a adição de tratamento químico por ácido acético 1% no segundo grupo (após as análises do primeiro grupo). As amostras “dente a/l” e “p/l quad” são amostras controle, sem qualquer modificação. A amostra “p/l marcado” é uma amostra após a irradiação teste por laser femtossegundo conforme indicado em 5.1.2.

No desenvolvimento e padronização das formas de análise realizadas, a primeira etapa foi a comparação dos espectros obtidos, verificando-se as alterações perceptíveis diretamente dos espectros logo após o processamento. A Figura 7 ilustra a comparação entre seis espectros obtidos na análise dos dentes por espectroscopia Raman. Na análise visual da imagem, podemos perceber as diferenças apresentadas pelos espectros, principalmente em relação às intensidades dos picos.

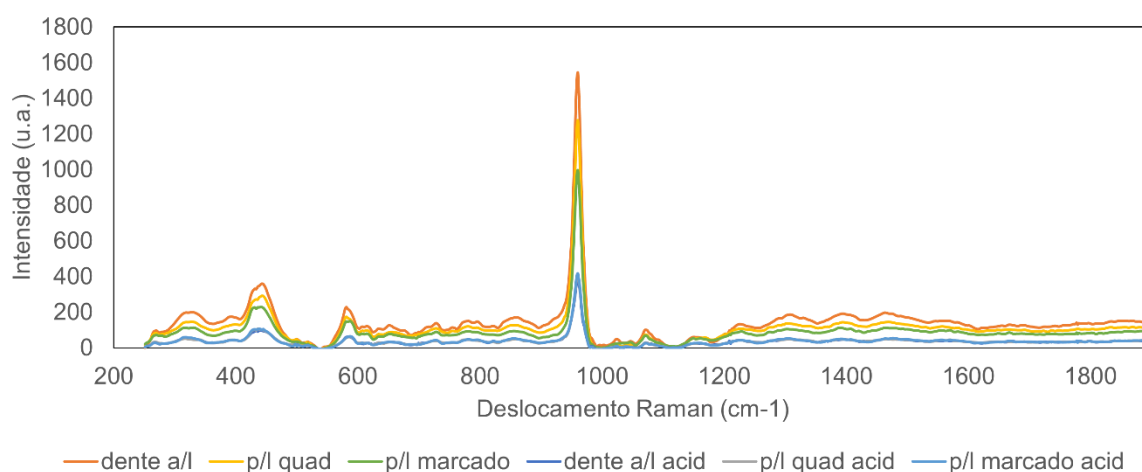


Figura 7 - Espectro Raman de seis amostras após processamento pela rotina do MatLab. Algumas diferenças de intensidade de picos e área dos gráficos são perceptíveis diretamente dos espectros.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a análise visual do espectro, é realizada a análise das áreas dos picos de interesse, de forma a se verificar o quanto as mesmas se alteram em relação às demais. Esta análise traz uma perspectiva melhor de como cada amostra responde à técnica de espalhamento da luz, e como cada propriedade do tecido consegue ser diferenciado pelo espectro apresentado. A Figura 8 mostra as áreas para cada pico de interesse em cada amostra analisada. Apenas a comparação lado a lado para cada amostra não apresenta uma identificação de tendências claras de modificações, mas auxilia numa visão mais geral de o que ocorre no espectro de espalhamento para cada amostra. Da mesma forma, na Figura 9 vemos a comparação para as intensidades dos picos em cada amostra, dando a mesma ideia de mudanças mais gerais dentro de cada amostra.

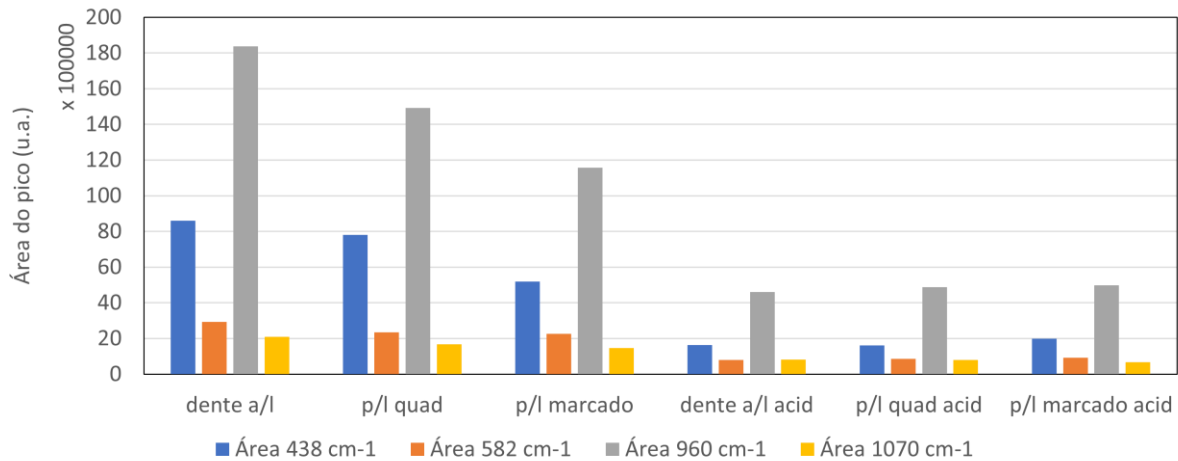


Figura 8 - Comparação gráfica das diferenças entre as áreas de cada pico de interesse, em relação a cada amostra analisado por espalhamento Raman.

Fonte: Elaborada pelo autor.

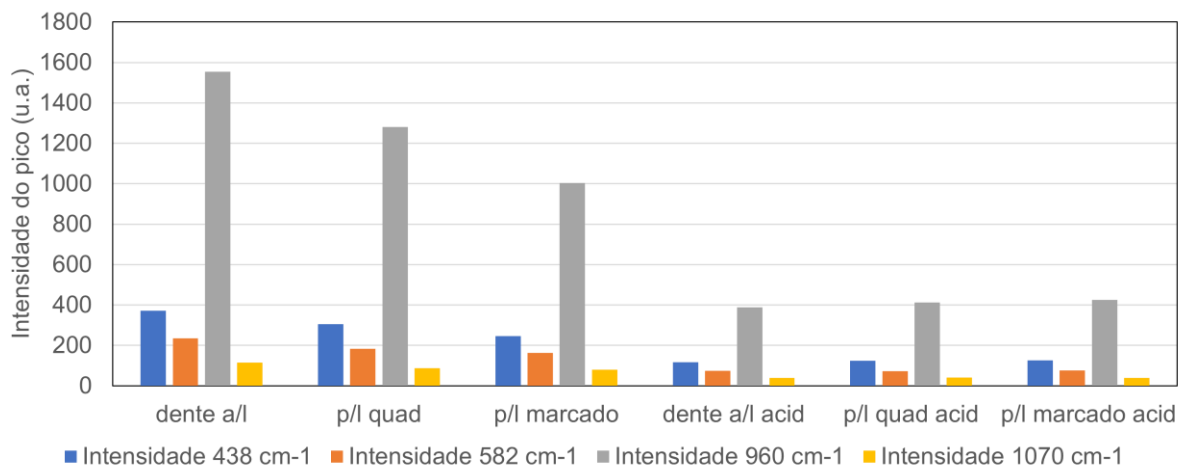


Figura 9 - Comparação gráfica das diferenças entre as intensidades de cada pico de interesse, para cada amostra analisado por espalhamento Raman.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, podemos comparar a variação dos espectros por cada um dos picos de interesse, agrupando as barras do gráfico de uma forma que facilita a visualização dos mesmos. Na Figura 10, conseguimos já verificar modificações mais claras entre as diferentes amostras quando comparados os mesmos, tanto para a comparação de áreas (a) quando para as intensidades (b) dos picos analisados.

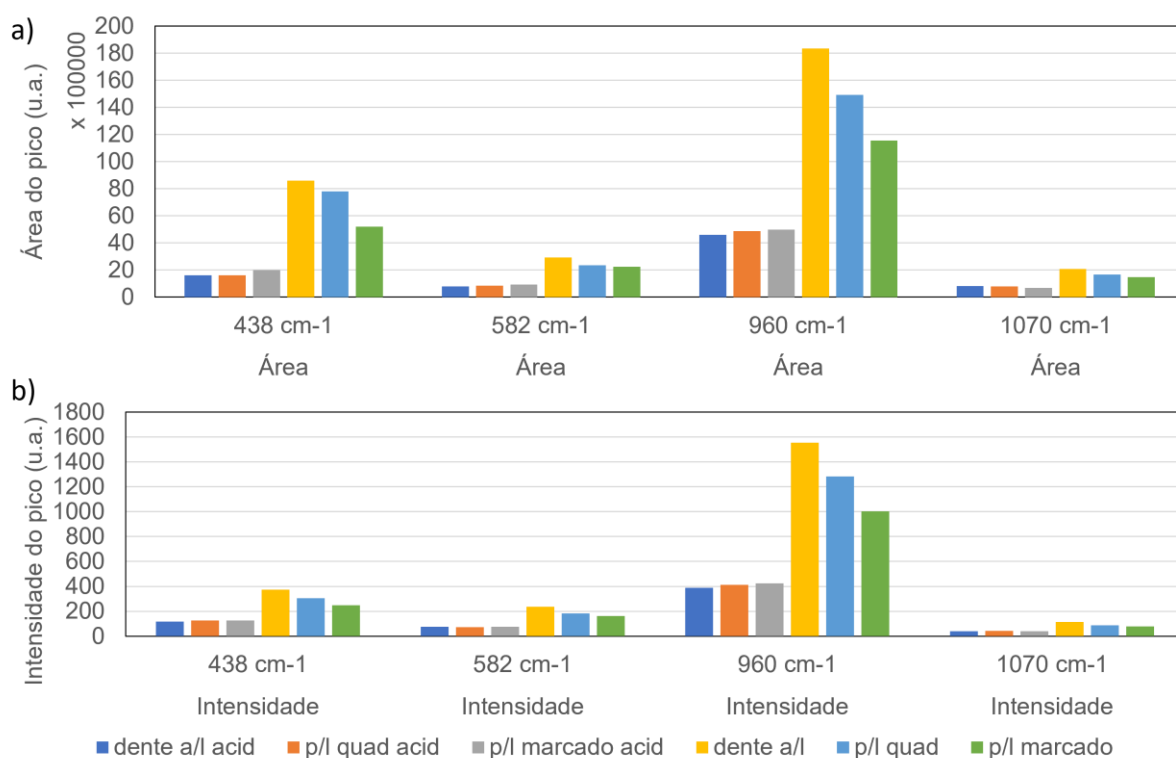


Figura 10 - Comparação gráfica das diferenças entre as áreas (a) e intensidades (b) para cada amostra analisada em relação a cada pico de interesse, por espalhamento Raman.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra análise realizada para os dados foi em relação às áreas totais dos espectros. Foi analisada a área sob o espectro para cada uma das amostras, fazendo-se distinção de amostras ou grupos, de acordo com a necessidade do estudo em questão. Podemos ver nos gráficos apresentados na Figura 11 que as áreas totais são significativas para a comparação entre grupos de amostras. As amostras apresentadas nos gráficos desta e das demais figuras desta seção indicam dois grupos de 3 amostras, uma antes (em azul) e uma após (em laranja) um tratamento em dentes com ácido acético. Vemos em Figura 11a que apenas a análise dos espectros, mesmo com agrupamento para cada grupo de amostra não é tão claro que há uma separação devido ao espectro como um todo. Entretanto, ao se analisar a área total dos espectros (Figura 11b), vemos que há uma diferença significativa entre o grupo de amostras antes do tratamento ácido (azul) e após o mesmo (laranja).

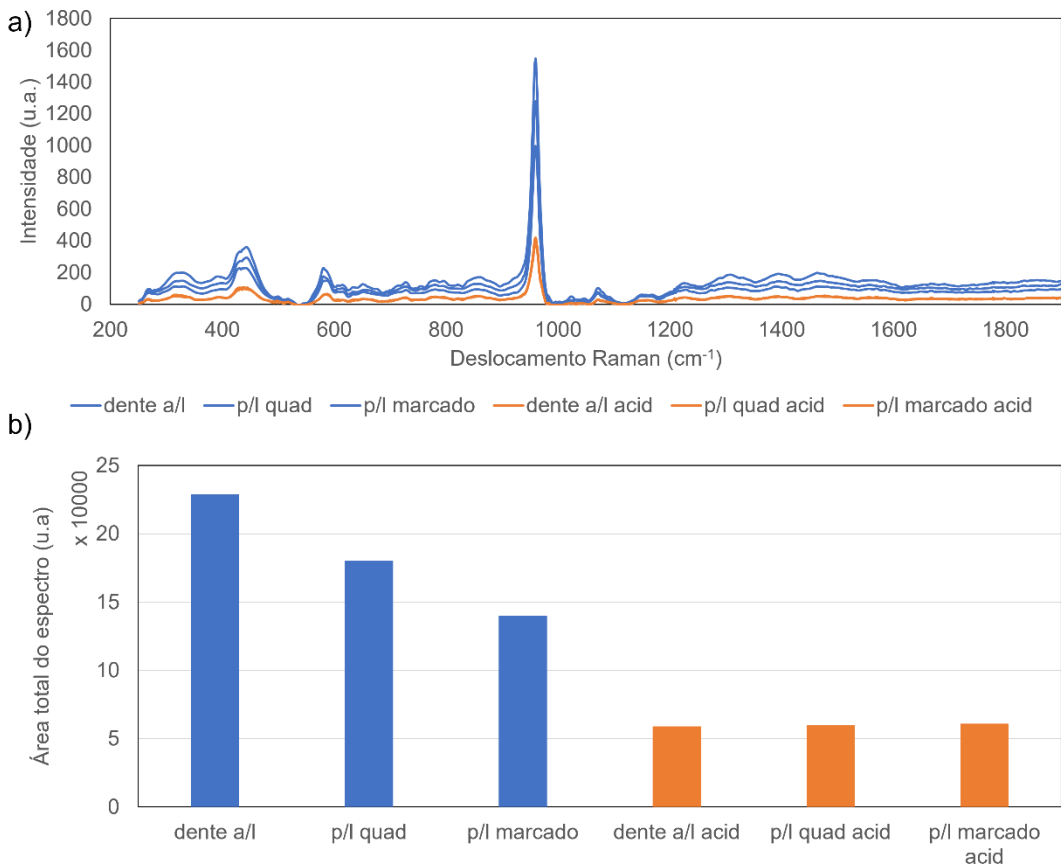


Figura 11 - Análise das áreas totais dos espectros. Em a) são mostrados os espectros das amostras agrupadas entre antes (azul) e após (laranja) o tratamento ácido. Em b) as áreas totais dos mesmos espectros para cada amostra antes (azul) e após (laranja) o tratamento ácido.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Também foram analisadas, para cada amostra ou grupo de amostra a razão entre os picos carbonato/fosfato. Estas relações são importantes para análise de alterações que acontecem no tecido dentário. (29) Portanto, uma das análises essenciais e presente em todos os estudos foi a desta relação. A Figura 12 mostra as relações entre as áreas (a) e intensidades (b) dos picos carbonato (1070 cm<sup>-1</sup>) e fosfato (960 cm<sup>-1</sup>) para cada amostra. Nesta comparação, é possível uma melhor análise das modificações que ocorrem dentro das amostras devido às alterações nas mesmas. Para todas as amostras vemos um aumento da relação carbonato/fosfato, e este aumento é um indicativo da desmineralização das mesmas devido ao tratamento ácido.

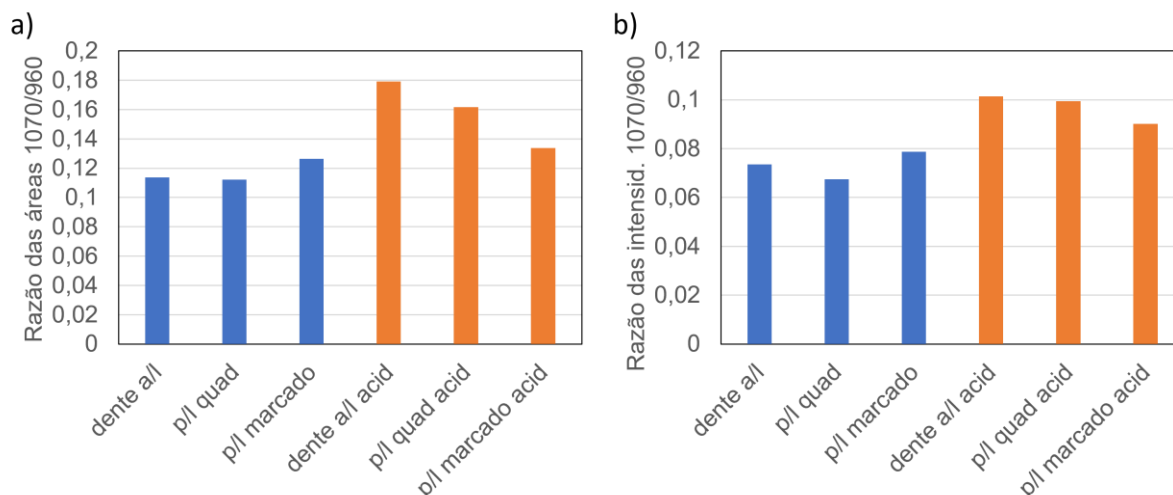


Figura 12 - Comparação das razões dos picos carbonato ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) e fosfato ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) nas amostras. Em a) é mostrada a razão das áreas dos picos e em b) a razão entre as intensidades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

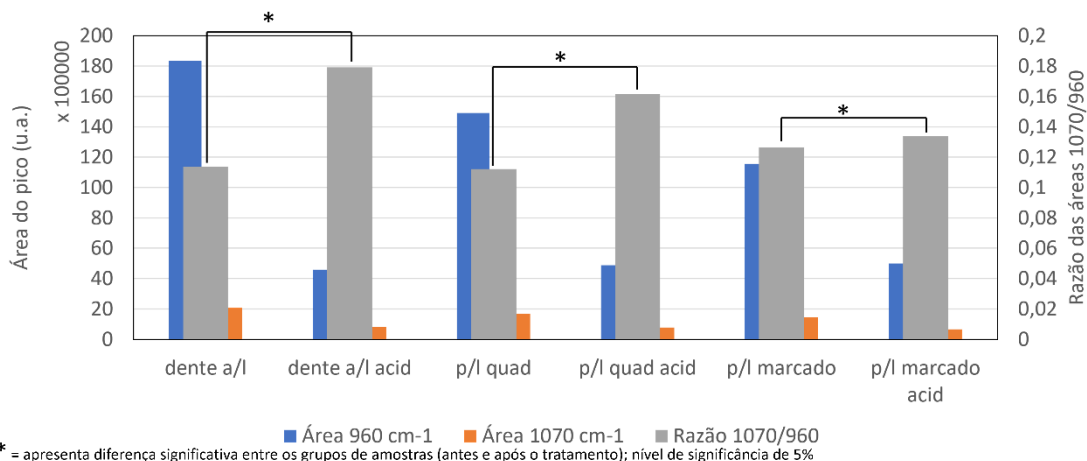
Uma comparação interessante que pode ser feita entre os gráficos apresentados na Figura 11b e na Figura 12a é que mesmo as áreas totais nas amostras do grupo antes do tratamento ácido (em azul) serem maiores que as do grupo após o tratamento (laranja), a razão carbonato/fosfato é maior no grupo após o tratamento, do que anteriormente.

Outra forma de se apresentar a relação da mudança das quantidades entre os íons carbonato e fosfato são apresentados na Figura 13. Nesta representação podemos ver que mesmo os valores apresentados para as áreas dos picos tanto carbonato ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) quanto para o fosfato ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) diminuírem quando comparados os grupos sem tratamento ácido (barras do lado esquerdo) em relação aos com tratamento ácido (barras da direita) nas áreas, a relação entre elas aumenta. Numa análise rápida este fato pode parecer contraintuitivo.

Entretanto, pensando que a espectroscopia Raman não é uma técnica quantitativa, o aumento ou a redução na intensidade ou área de um pico específico não é necessariamente um indicativo do aumento/redução da quantidade deste composto em análise, de forma direta. Isto é especialmente real quando se trata da análise de tecidos, que apresentam interações com outras moléculas presente neste meio. Portanto se faz necessária a análise de relações presentes nas amostras para uma interpretação mais precisa dos resultados obtidos.

Além disso, para todas as amostras e grupos, foram feitas análises estatísticas de comparação entre amostras e entre grupos, de forma a se analisar diferenças estatísticas significativas ou não. Foi então performado o teste One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, com um nível de significância de 5% para avaliar as diferenças entre os grupos ou entre duas amostras.

Todas as análises aqui descritas foram realizadas com as amostras descritas em 5.1.1.



\* = apresenta diferença significativa entre os grupos de amostras (antes e após o tratamento); nível de significância de 5%

Figura 13 - Análise da razão carbonato/fosfato por outra forma de apresentação  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 Projeto Raman e Hipomineralização

### 5.2.1 Descrição, seleção e preparação das amostras

As amostras utilizadas neste projeto consistiram em 20 dentes afetados por Hipomineralização do esmalte, especificamente molar incisor Hipomineralização (HMI). Esses dentes foram classificados de acordo com a gravidade da condição e separados em dois grupos: um grupo com HMI leve e outro grupo com HMI grave.

Os dentes foram separados e categorizados com base na presença de diferentes tipos de opacidades no esmalte, que são características da HMI. O grupo com HMI leve consistiu em dentes com opacidades brancas ou creme, enquanto o grupo com HMI grave incluiu dentes com opacidades amarelas e/ou castanhas.

Essa classificação e categorização dos grupos permitiram a comparação das características das imagens geradas pelo OCT e espectroscopia Raman entre os dentes afetados por HMI leve e grave, contribuindo para a compreensão da diferenciação entre os tipos de opacidades e a avaliação da severidade da Hipomineralização.

Para cada dente, foram realizadas varreduras em áreas afetadas e não afetadas, e suas imagens ópticas correspondentes foram capturadas. As amostras foram então submetidas a análises qualitativas e quantitativas das imagens geradas pelo OCT, permitindo a avaliação visual das diferenças entre o esmalte afetado e não afetado, bem como a análise estatística das características das imagens entre os grupos de severidade da HMI.

Toda a seleção e preparação das amostras foram realizados pelo Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho e sua estudante, MSc. Áyla Natalia Ferezin, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP – USP).

### 5.2.2 Coleta de dados por espectroscopia Raman



A coleta de dados de espalhamento Raman dos dentes assim como a análise e processamento dos dados foi feita seguindo o protocolo descrito nos itens 5.1.3, 5.1.4 e 5.1.5. Entretanto, a aquisição foi feita nas áreas específicas dos dentes que apresentavam os defeitos (selecionados de forma visual) e organizados segundo os grupos de gravidade leve ou grave para HMI. Também foi feita a leitura de todas as amostras numa região claramente sadia do dente (sem defeito) para controle.

Foram adicionadas, para as análises destas amostras, outros dois picos:  $1270\text{ cm}^{-1}$ , relacionados aos modos vibracionais  $\nu_1$  do  $\text{CO}_2$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , relacionado à amida III,  $\text{CH}_2$  e amida I. (32)

Para a espectroscopia Raman, as amostras foram classificadas em cinco classes: hígido (sádios/controle); defeitos 21 e 22 (HMI leve); e defeitos 3e e 3d (HMI grave). As análises foram realizadas por espectroscopia Raman e fluorescência, com a região analisada incluindo dentina, esmalte e regiões com defeitos específicos. As áreas dos dentes analisadas incluíram regiões saudáveis e com defeitos, permitindo a comparação das alterações espectrais entre elas.

### **5.2.3 Coleta de dados por espectroscopia de Fluorescência**

Foram feitas, em adição à espectroscopia Raman, a análise por espectroscopia de fluorescência das mesmas amostras. Em cada uma, foi analisada a região saudável do dente (hígida), e a região com defeito, conforme enunciado na seção anterior.

As análises foram feitas utilizando um sistema de espectroscopia montado com dispositivos comerciais desenvolvido pelo CEPOF/USP. O sistema consiste de um laser Nd:YAG duplicado, emitindo em  $532\text{ nm}$ , e um laser de diodo, emitindo em  $405\text{ nm}$ , utilizados como fontes de excitação. O sistema possui uma sonda de investigação do tipo Y (Ocean Optics, EUA) com duas fibras ópticas de  $600\text{ }\mu\text{m}$ , uma entregando o laser de excitação e a outra coletando a luz reemitida do tecido alvo. Um espectrômetro USB2000 (Ocean Optics) permitiu a avaliação da fluorescência em uma faixa espectral entre  $350\text{ nm}$  e  $1000\text{ nm}$ . Um filtro de passagem longa em  $550\text{ nm}$  (OGG550, Schott, EUA) foi usado para remover a luz retroespalhada antes de entrar no espectrômetro; apenas a emissão de fluorescência é avaliada pelo sistema. Um laptop está conectado ao espectrômetro, e o software OBase32.exe (Ocean Optics) é o utilizado para adquirir e salvar os dados espectrais. O sistema de espectroscopia foi alojado em um estojo convencional de gravador de câmera, possibilitando sua portabilidade. (35-36)

As análises foram realizadas nos dois diferentes comprimentos de onda, o primeiro em  $405\text{ nm}$  (violeta) e o segundo em  $532\text{ nm}$  (verde).

#### **5.2.4 Coleta de dados por OCT**

Outra técnica empregada neste trabalho foi a análise qualitativa e quantitativa das imagens geradas pelo OCT. A análise qualitativa foi realizada por meio da avaliação visual das imagens geradas pelo OCT, enquanto a análise quantitativa foi realizada por meio da aplicação da Anova utilizando o teste de Tukey para avaliar as diferenças nas texturas das imagens entre os grupos de dentes com HMI leve, HMI grave e dentes não afetados. Além disso, foram utilizadas técnicas de processamento de imagem para avaliar as características intrínsecas das imagens e melhorar a capacidade diagnóstica. As coletas de imagens de OCT foram realizadas utilizando um sistema de aquisição de imagens OCT (Telesto® 320C, SD-OCT, Bergkirchen, Bavaria, Alemanha) com uma fonte de luz de domínio espectral operando a 1.300 nm.

A coleta de dados e análises principais por esta técnica foi performada pela Dra. Claudia Barreira com auxílio do Prof. Fabrício e MSc. Áyla.

### **5.3 Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia**

#### **5.3.1 Seleção, coleta e preparação das amostras**

As amostras utilizadas neste estudo consistiram em 45 molares permanentes humanos, superiores e inferiores, recém-extraídos e hígidos, provenientes de indivíduos que não foram submetidos a nenhum tratamento oncológico. Esses dentes foram obtidos junto ao Banco de Dentes da FORP/USP e armazenados em água destilada a 4°C até o seu uso. Antes da análise, os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água, seguido de exame tátil e visual para selecionar apenas os dentes que não apresentavam fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura. Os dentes foram selecionados e armazenados em solução de timol a 0,1% supersaturada durante uma semana. Em seguida, foram lavados em água por 24 horas e armazenados em água destilada a 4°C até o seu uso.

Durante o procedimento de irradiação, os espécimes foram dispostos em placas de acrílico para cultura de células de 24 poços, de maneira que todos recebessem a mesma irradiação direta por unidade de área. Com o intuito de mantê-los em um ambiente úmido, simulando as características da cavidade bucal, durante a irradiação, cada poço foi preenchido com 10ml de água destilada, recobrimo totalmente os cilindros de PVC. Ao final de cada procedimento, a água destilada era desprezada e os corpos de prova mantidos em saliva artificial, em estufa a 37°C até o próximo ciclo de irradiação, quando, então, a saliva era novamente substituída por água destilada. Os dentes foram submetidos à irradiação em acelerador linear com energia de 6MV, dose de 60Gy, em um total de 30 frações por seis semanas, em fração de dose de 2Gy/dia, durante cinco dias consecutivos por semana.

As amostras foram organizadas em grupos de acordo com a dose de irradiação recebida. Foram constituídos grupos de controle não irradiado, grupo irradiado com dose convencional de 60Gy e grupos reirradiados com novas doses de até 30Gy, 40Gy e 50Gy. Essa organização permitiu comparar os efeitos da reirradiação com

diferentes doses em relação ao grupo irradiado com a dose convencional e ao grupo controle não irradiado, fornecendo insights sobre os danos causados pelas diferentes exposições à radiação nos tecidos dentários.

Toda a seleção e preparação das amostras foram realizados pela aluna MSc. Thais Tedeschi dos Santos (FORP – USP).

### **5.3.2 Coleta de dados por espectroscopia Raman**

A análise dos dentes, coleta e análise de dados obtidos por Espectroscopia Raman foi conduzida de acordo com o procedimento descrito nos itens 5.1.3, 5.1.4 e 5.1.5. Porém, cada amostra passou por análise em seis pontos distintos: Esmalte Coronário na face Vestibular (EC\_V), Esmalte Coronário na face Lingual/Palatina (EC\_L), Fundo de Sulco (FS), Ponta de Cúspide (PC), Junção Amelodentinária na face Vestibular (JAD\_V) e Junção Amelodentinária na face Lingual/Palatina (JAD\_L).

Todas estas regiões foram analisadas da mesma forma, fazendo o ajuste de distância de cada amostra ao foco da probe do espectrômetro, uma vez que de acordo com o posicionamento de cada dente, a distância do mesmo ao foco era ligeiramente diferente.

As análises descritas foram feitas para cada amostra ou grupo de amostras.

### **5.3.3 Coleta e análise de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura**

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram analisadas por meio de comparação qualitativa. Os espécimes foram preparados para análise em MEV por meio de desgaste com lixas de carvão de silício de granulação 600, 800, 1200 e 2000, seguido de polimento com pastas de diamante de granulação 6, 3 e 1  $\mu\text{m}$ . Em seguida, foram lavados em água destilada, secos em estufa a 37°C e metalizados com ouro em um equipamento de metalização por pulverização catódica. As imagens foram obtidas em um Microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) e sistema de análise química qualitativa e quantitativa OXFORD para detecção de elementos entre Boro e Urânio.

### **5.3.4 Análises dos dados e processamentos**

A partir dos dados brutos obtidos por espectroscopia Raman, foram realizadas análises comparativas entre os grupos, considerando a área geral dos espectros e a intensidade e área dos picos de interesse. Além disso, as alterações nos espectros Raman foram avaliadas em relação aos grupos não irradiados e irradiados, bem como entre os diferentes grupos reirradiados, utilizando testes estatísticos como o teste Kolmogorov–Smirnov, seguido pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, com um nível de significância de 5%. Essas análises permitiram estimar as variações em relação às amostras não irradiadas e evidenciaram as alterações cumulativas causadas pela radioterapia nos tecidos dentários. Além disso, as análises estatísticas

dos dados numéricos obtidos forneceram suporte quantitativo para as alterações observadas, demonstrando a consistência e relevância das mudanças identificadas nos parâmetros espectrais, como intensidade, posição e largura dos picos Raman, bem como nas áreas totais dos espectros. Essas análises estatísticas foram fundamentais para a compreensão dos efeitos da radioterapia nos tecidos dentários, fornecendo insights importantes sobre as alterações estruturais e químicas decorrentes da irradiação.

#### **5.4 Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico**

##### **5.4.1 Seleção, coleta e preparação das amostras**

Para este estudo, foram selecionados 36 dentes que não apresentavam trincas, fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura. Esses dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% supersaturada, durante 1 semana, lavados em água corrente durante 24 horas, colocados em recipientes contendo água destilada e, novamente, armazenados sob refrigeração à temperatura de 4°C, até o início dos experimentos.

Toda a seleção e preparação das amostras foram realizados pela aluna MSc. Renata Sant' Anna Consiglieri (FORP – USP).

##### **5.4.2 Coleta de dados por espectroscopia Raman**

Para as análises por espalhamento Raman, foram utilizadas 16 hemisseções dentais sendo separadas em 8 amostras controles, 4 com tratamento convencional (dois para análise da dentina e dois para análise do esmalte) e 4 na modalidade Hipofracionada (dois para análise da dentina e dois para análise do esmalte). Os dentes foram categorizados conforme as três classes distintas: Controle, Convencional e Hipofracionado. A análise foi conduzida por Espectroscopia Raman, utilizando o mesmo protocolo descrito nos itens 5.1.3, 5.1.4 e 5.1.5. As áreas examinadas compreenderam Dentina e Esmalte.

##### **5.4.3 Análises dos dados e processamentos**

Neste trabalho, foram realizadas análises estatísticas abrangentes para avaliar as diferenças entre os grupos de amostras. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar a porcentagem de cálcio, fosfato e oxigênio entre os grupos, tanto no esmalte quanto na dentina, utilizando-se o Origin, versão 2023b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, conforme evidenciado pelos valores de  $p > 0,05$ . Essa abordagem estatística robusta permitiu uma avaliação precisa das variações nos elementos químicos presentes nas amostras, fornecendo uma compreensão mais aprofundada da composição e

estrutura das mesmas. Essas análises estatísticas desempenharam um papel fundamental na validação dos resultados obtidos por meio das técnicas de espectroscopia utilizadas, contribuindo significativamente para a interpretação dos dados e para a confiabilidade dos achados



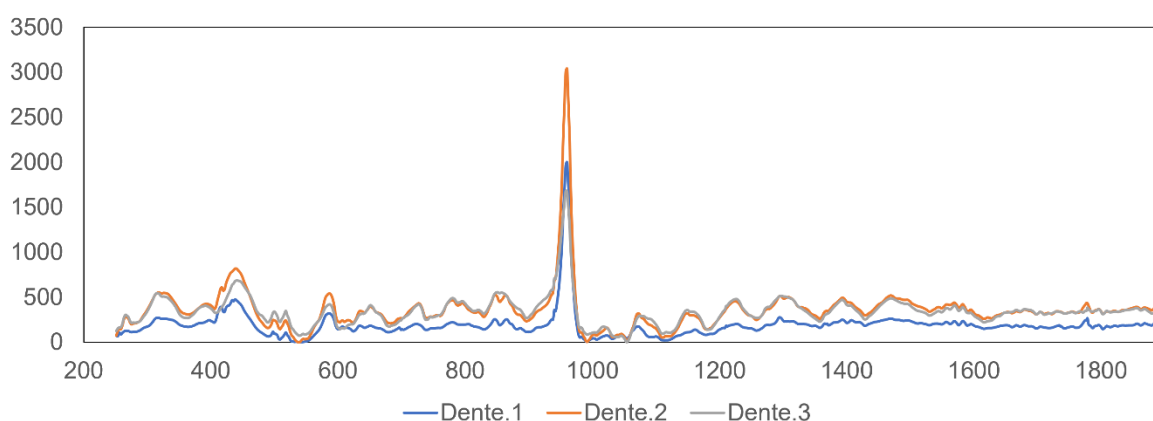
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Projeto Raman e irradiação por femtossegundo em dentes sadios

#### 6.1.1 Resultado das marcações por laser femtossegundo

Analisando as amostras antes e após a marcação pelo laser, foram observadas diferenças entre as amostras. Apenas analisando os espectros conforme apresentados na Figura 14, não é muito notável a diferença entre os dentes irradiados e os originais.

a) Dentes não irradiados



b) Dentes irradiados

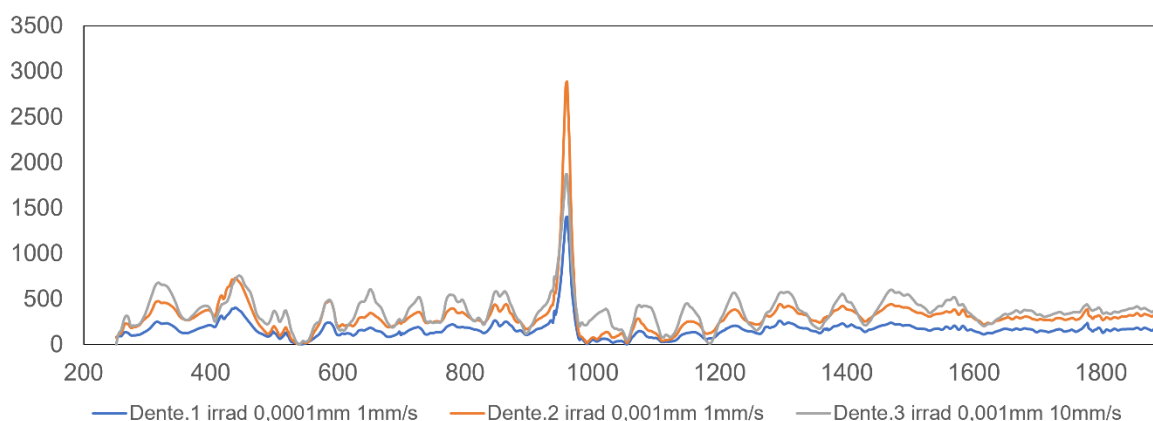


Figura 14 - Comparação entre espectros dos dentes não irradiados (a) e irradiados (b) por laser femtossegundo. Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, comparando-se a diferença entre cada um dos espectros conseguimos ver uma diferença mais substancial no Dente 1, onde foram utilizados parâmetros de maior intensidade. Na Figura 15 (a) são apresentados os espectros de subtração entre os espectros de a) e b) da Figura 14. Na análise das curvas podemos ver que o Dente 1 apresenta maior variação em relação à origem (desvio padrão 49,269) que as demais (dente 2: 25,192 e dente 3: 47,77), além de apresentar maiores diferenças visuais (aparência mais esbranquiçada da superfície) em relação à original. Além disso, analisando-se a razão entre a área dos picos de interesse entre as

amostras com e sem a marcação à laser (Figura 15b) vemos que apenas para o pico em  $438\text{ cm}^{-1}$  a razão “não irradiado/irradiado” foi menor que no Dente 2. Nos outros 3 casos, apresentou a maior razão, e, portanto, maior modificação da superfície.

Portanto, estes foram os parâmetros escolhidos para as demais etapas deste projeto. A energia transferida para a amostra com estes parâmetros corresponde a aproximadamente  $1\text{ mJ}$  de energia por pulso (90 fs) e 15s de irradiação em cada amostra.

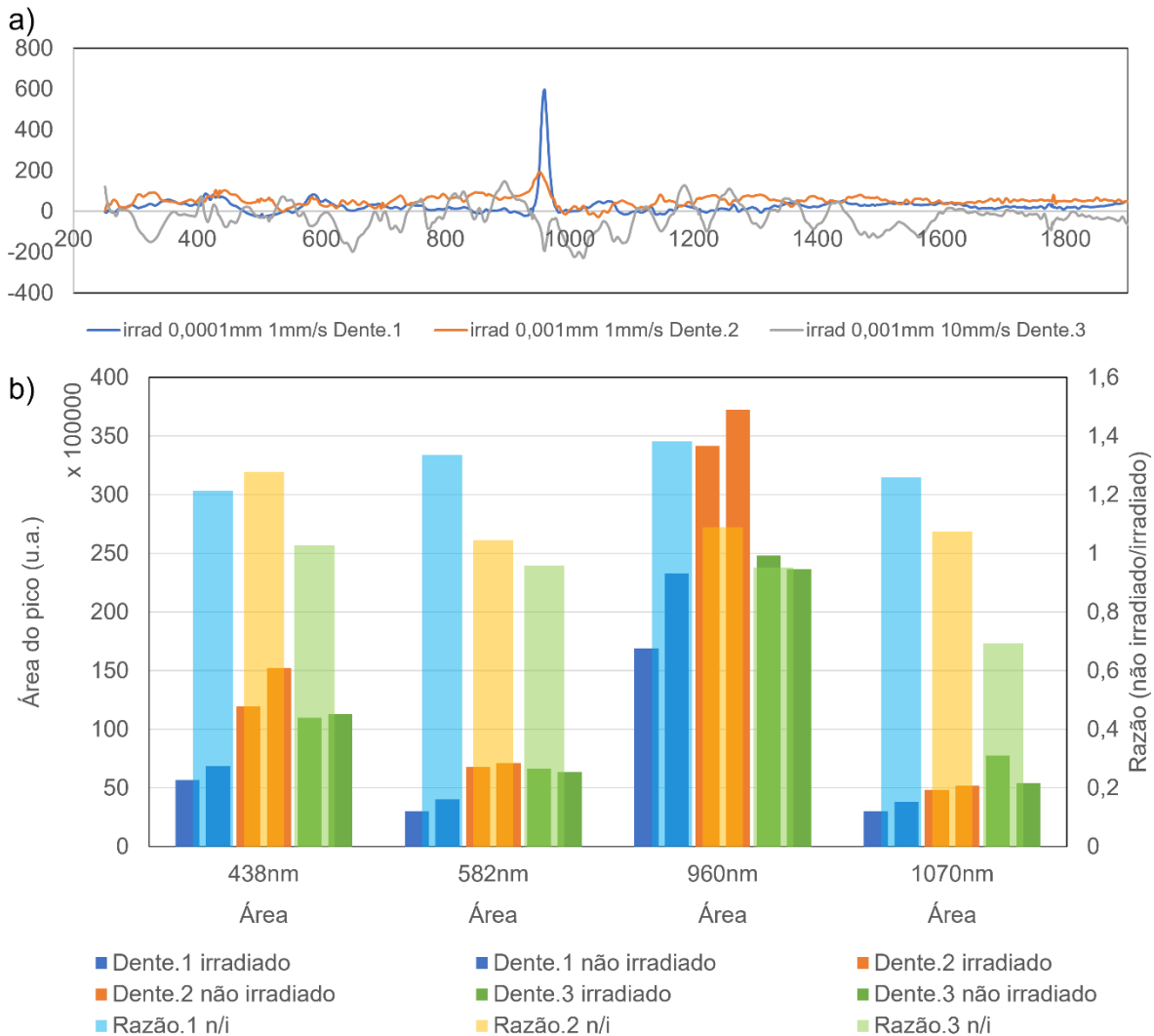


Figura 15 - Resultado da diferença entre os espectros apresentados na Figura 14. a) subtração dos espectros. b) picos de interesse e razão entre eles.

Fonte: Elaborada pelo autor.

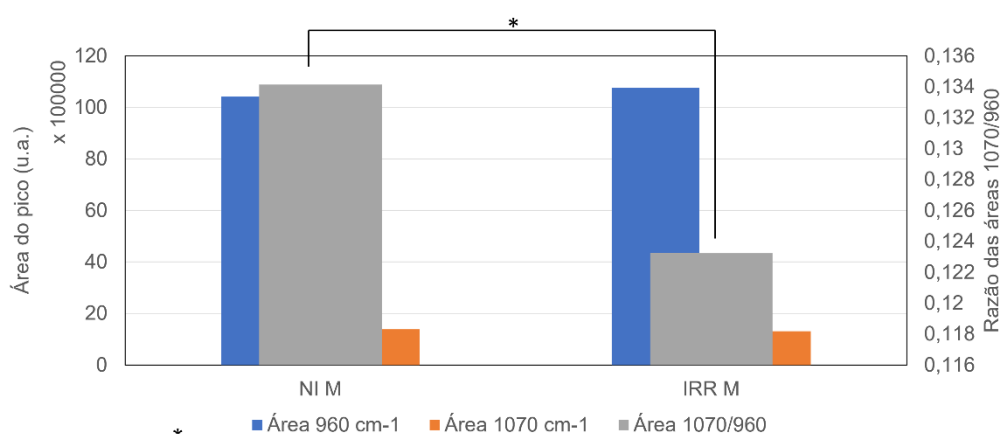
### 6.1.2 Resultados das análises por espalhamento Raman e MEV

Os espectros de Raman permitiram a identificação de picos relacionados aos compostos característicos do esmalte dental como os íons fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  nos modos vibracionais  $\nu_1$  ( $960\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $438\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu_4$  ( $582\text{ cm}^{-1}$ ) e carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  no modo vibracional  $\nu_1$  ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) nos espectros analisados. (37)



Foram observadas mudanças significativas nos valores de área e intensidade dos picos de interesse quando comparados os grupos irradiados e não irradiados. Um aumento estatisticamente significativo nos valores de área para os picos de fosfato a  $438\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$  foi observado no grupo irradiado em comparação com o grupo não irradiado. No entanto, nenhuma mudança significativa foi observada para o pico de fosfato a  $582\text{ cm}^{-1}$ . Foi observada uma diminuição significativa no valor da área do grupo irradiado para o pico a  $1070\text{ cm}^{-1}$  em comparação com o grupo não irradiado. Também foi observado um aumento na intensidade dos picos a  $438\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ . (37)

Analisando-se a relação carbonato/fosfato, verificou-se a redução desta razão após a irradiação pelo laser. Com este resultado, podemos dizer que os dentes irradiados apresentam menor tendência à desmineralização, quando comparado com os dentes não irradiados.



\* = apresenta diferença significativa entre os grupos de amostras (antes e após o tratamento); nível de significância de 5%

Figura 16 - Resultado das análises por Raman para os picos em  $960\text{ cm}^{-1}$  (fosfato) e  $1070\text{ cm}^{-1}$  (carbonato) assim como a razão entre eles, indicando a diminuição desta razão para os dentes irradiados por laser femtossegundo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise por microscopia confocal a laser (CLSM) e a microscopia eletrônica de varredura (SEM) revelaram mudanças morfológicas no esmalte devido à irradiação do laser de femtossegundo, fornecendo informações valiosas sobre os efeitos do tratamento a laser no esmalte em um nível microscópico. (37)

### 6.1.3 Artigo publicado

O artigo "Chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel using subablative parameters", escrito por Heitor Hussni Casarin, Vicente Silva Mattos, Jarbas Caiado de Castro Neto e Michelle Alexandra Chinelatti, apresenta a investigação aqui descrita sobre os efeitos da irradiação do esmalte dental com laser de femtossegundo em parâmetros subablativos. Publicado na revista *Microscopy Research and Technique*, o estudo revela resultados significativos obtidos por meio de espectrometria Raman, análise microscópica e testes estatísticos, onde são identificadas mudanças químicas e morfológicas distintas no esmalte dental. Os

resultados obtidos contribuem para o avanço do conhecimento científico no campo da odontologia e destacam a relevância do uso de técnicas avançadas de análise para compreender as alterações induzidas pelo laser no esmalte dental. (37)

## 6.2 Projeto de investigação da Hipomineralização em dentes

### 6.2.1 Resultados das análises por espalhamento Raman

Os resultados obtidos através da espectroscopia Raman mostraram que as alterações geradas pelos defeitos detectados alteram a composição dos dentes. Foram analisadas diversas regiões em cada dente, e os espectros obtidos foram tratados utilizando rotina de processamento em MatLab. Para melhor organização e identificação dos dados, nesta etapa foram analisadas as médias dos espectros, áreas e intensidades dos picos, agrupando-os para cada análise.

A Figura 17 apresenta dois espectros obtidos para a amostra P1A5, um na região com defeito 21 e outra na região hígida do dente. Neste são identificados os picos detectados em ambos os espectros, e é notável a diferença em todos os pontos do espectro quando comparados.

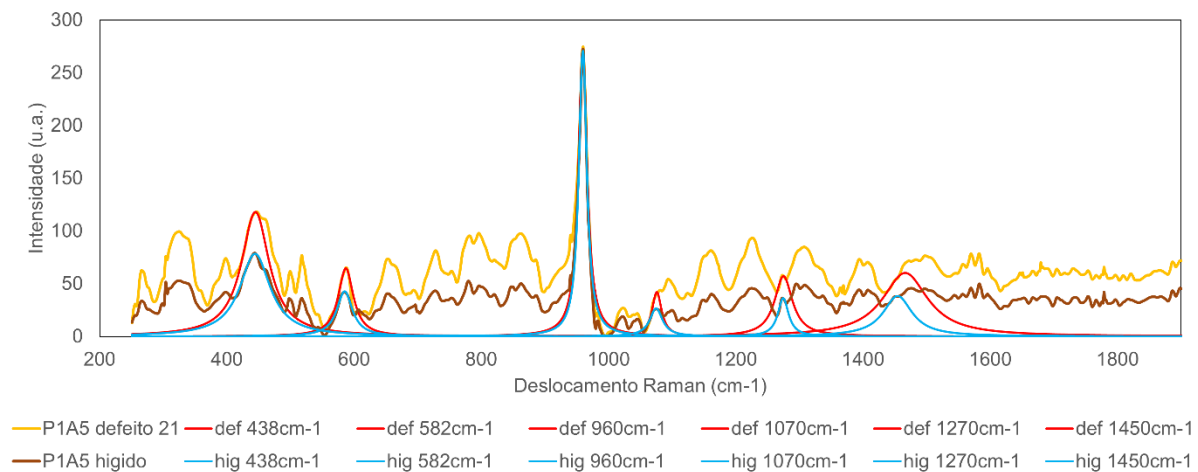
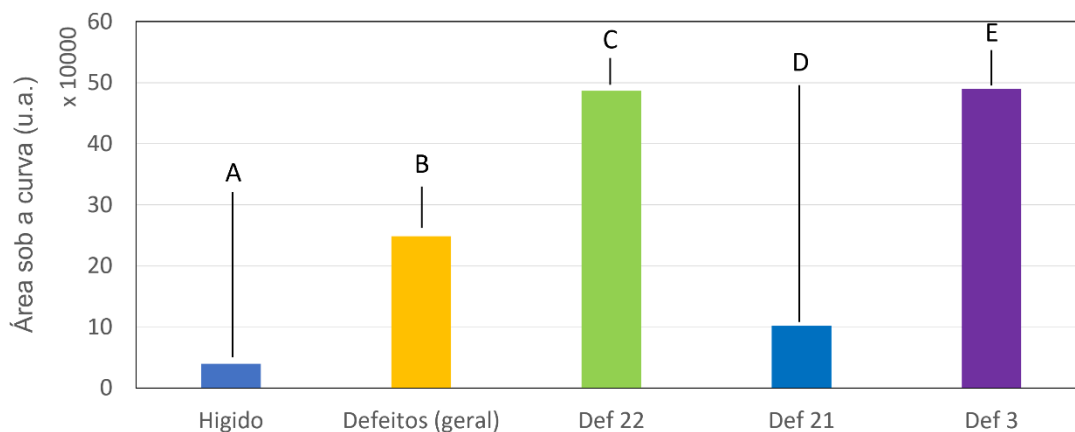


Figura 17 - Espectro Raman para amostra P1A5 indicando os espectros e cada um dos seis picos de interesse encontrado para as amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise das alterações nas áreas totais dos espectros de acordo com o tipo de defeito em relação à região hígida da amostra mostrou o aumento da área total para todos os defeitos observados. Na Figura 18 estão apresentadas as médias para as áreas totais dos grupos de amostras. Vemos que a área total para o grupo controle saudável (hígido) é menor que as áreas para todos os defeitos, tanto de forma individual quanto agrupados.

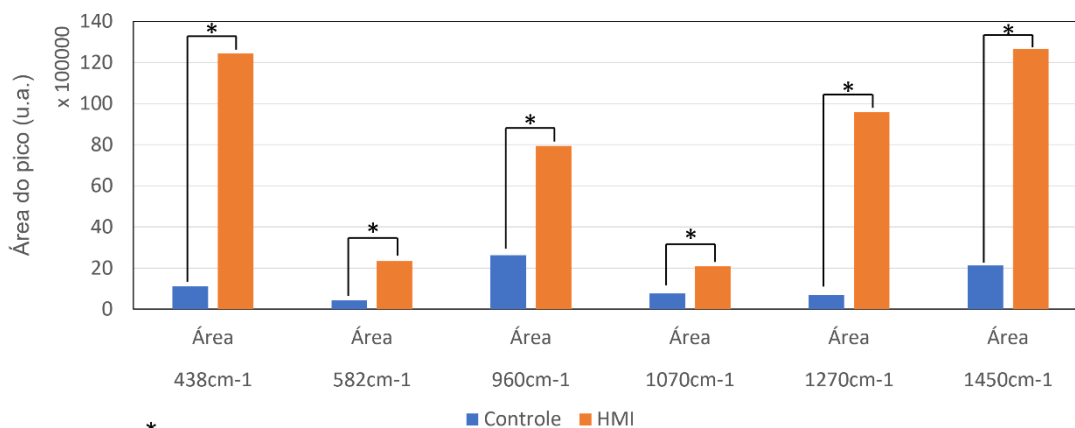


Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos de amostras; nível de significância de 5%

Figura 18 - Área total sob o espectro para as amostras controle sadios (hígido) e para os defeitos agrupados (geral) e para os 3 grupos de defeito 22 e 21 (HMI leve) e 3 (HMI grave).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A comparação da área de cada um dos picos de interesse também mostrou aumento no valor da área para todos. Os picos selecionados para análise foram relacionados ao fosfato, modos vibracionais na hidroxiapatita, alongamento vibracional simétrica dos íons fosfato, pico do carbonato, modos vibracionais do CO<sub>2</sub>, amida III, CH<sub>2</sub> e amida I. A Figura 19 apresenta a diferença das áreas entre as amostras sem defeito (controle) em relação à com defeito.

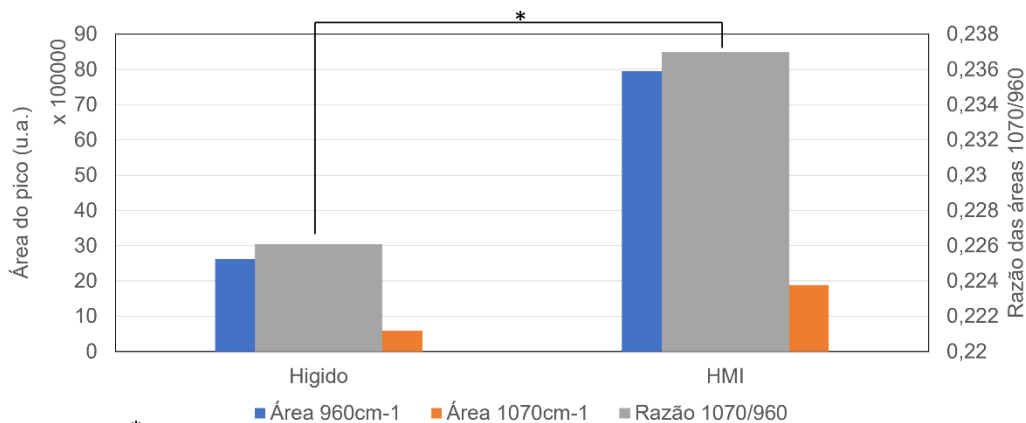


\* = apresenta diferença significativa entre os grupos de amostras (antes e após o tratamento); nível de significância de 5%

Figura 19 - Área dos picos analisados, em relação ao grupo controle (hígido) e os grupos com defeito, indicando o aumento destes para todos os picos analisados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, foi feita a análise da razão carbonato/fosfato, através da análise da razão entre os valores obtidos para os picos de ambos. Os resultados não apresentaram valores quantitativos, mas a redução na relação carbonato/fosfato é um indicativo de uma maior desmineralização do dente nestas regiões apresentando os defeitos. Este resultado pode ser observado na Figura 20. Nesse gráfico é apresentado tanto o valor para a área dos picos referentes ao carbonato e ao fosfato quando a razão entre eles, maior nas regiões com defeito (HMI) quando comparado com o controle, indicando uma possível maior desmineralização nas áreas afetadas.



\* = apresenta diferença significativa entre os grupos de amostras (antes e após o tratamento); nível de significância de 5%

Figura 20 - Resultado das análises por Raman para os picos em  $960\text{ cm}^{-1}$  (fosfato) e  $1070\text{ cm}^{-1}$  (carbonato) assim como a razão entre eles, indicando o aumento desta razão para os dentes com defeito (HMI).

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6.2.2 Resultados obtidos nas análises de Fluorescência

Neste projeto também foi utilizada a espectroscopia de fluorescência para analisar as mesmas amostras, utilizando a maleta de diagnóstico por fluorescência do CEPOF/USP. Foram utilizados os lasers verde e violeta para as análises. Os resultados foram apresentados em espectros de fluorescência para todas as amostras excitadas por ambos comprimentos de onda. A análise dos espectros de fluorescência mostrou que, ao se analisar a média dos espectros, há uma diferença significativa entre as amostras saudáveis e as amostras com defeito.

Podemos verificar em Figura 21a que as médias para as amostras tanto na análise por laser violeta quanto para o laser verde possuem diferenças quando comparados os grupos controle (hígido) e o grupo defeito (HMI). Entretanto, olhando a Figura 21b podemos notar que as áreas totais se alteram significativamente para o laser violeta (10,31% menor em HMI quando comparada à controle) mas com diferença sutil em relação aos resultados com o laser verde (0,625% menor).

Entretanto, ao se analisar os espectros individuais, esta diferença não é tão evidente. Portanto, novas formas de análise e processamento dos dados se fazem necessárias para uma melhor definição dos resultados obtidos e de quantificação das diferenças espectrais entre as amostras saudáveis e as que apresentam HMI.

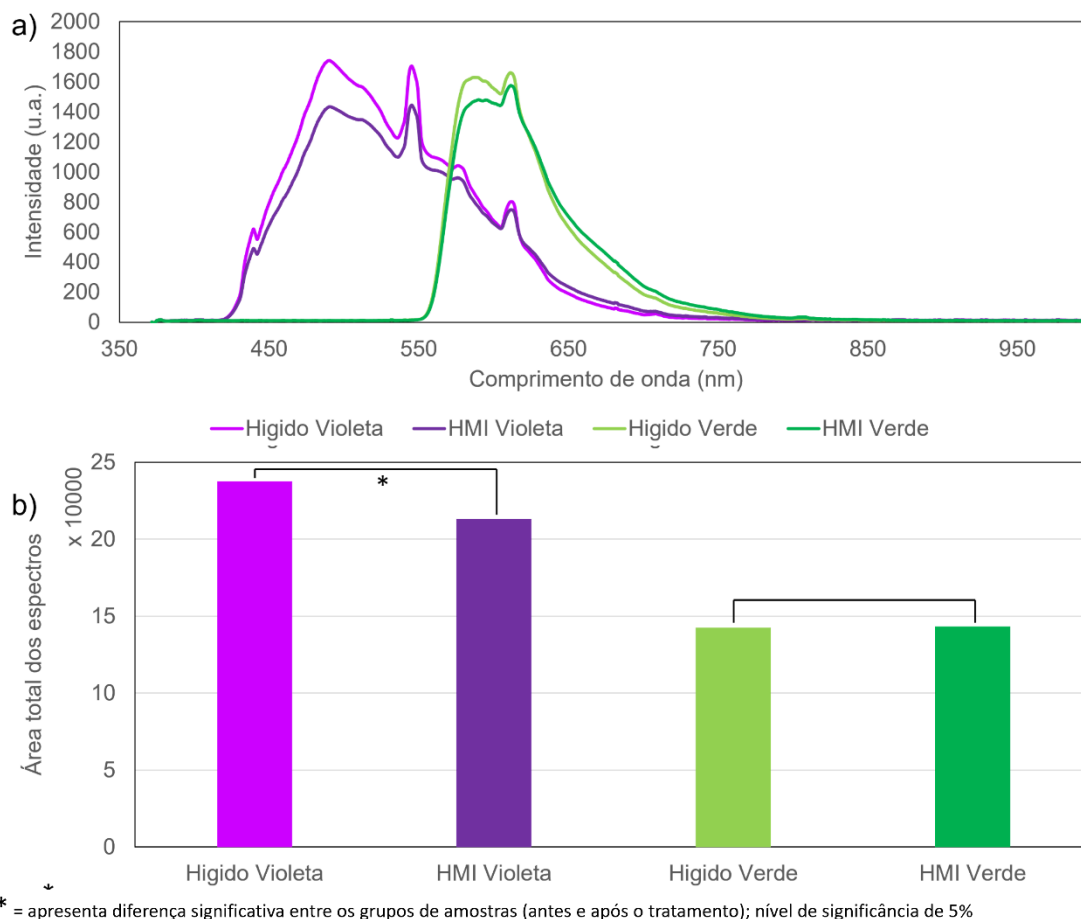


Figura 21 - Resultado dos espectros de fluorescência coletado para os grupos controle (hígido) e com defeito (HMI) para os lasers violeta e verde. Em a) espectros de fluorescência para os quatro grupos. b) área total dos espectros para cada grupo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 6.2.3 Resultados obtidos nas análises por OCT

O estudo empregou a Tomografia de Coerência Óptica (OCT) para uma avaliação detalhada e quantitativa de dentes afetados por HMI, resultando em descobertas relevantes tanto qualitativas quanto quantitativas.

Na análise qualitativa, observou-se a presença de linhas brilhantes em relação à superfície do esmalte, acompanhadas por um significativo espalhamento de fótons imediatamente abaixo dessa superfície. A identificação de áreas hipomineralizadas foi facilitada pela distribuição de sombreamento, onde o sinal de espalhamento tornou-se um critério para o diagnóstico valioso. Notavelmente, as imagens geradas pelo OCT revelaram diferenças marcantes entre o esmalte afetado pela HMI e as áreas não afetadas, sendo essas distinções ainda mais acentuadas nos casos de HMI Grave. (38)

A análise quantitativa, por sua vez, aplicou o teste de variância Anova com o teste de Tukey para avaliar as médias do coeficiente de atenuação óptica, não revelando diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, ao explorar a análise de correlação, homogeneidade e contraste das imagens, surgiram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Curiosamente, o grupo com HMI grave

exibiu maior homogeneidade e correlação, embora apresentasse menor contraste em comparação com outros grupos. Esses resultados destacam a capacidade do OCT não apenas para identificar qualitativamente as áreas afetadas pela HMI, mas também para fornecer métricas quantitativas que diferenciam as características ópticas dessas regiões, enriquecendo a compreensão sobre a severidade da condição. (38)

Esses resultados foram obtidos por meio da captura de imagens ópticas correspondentes às áreas afetadas e não afetadas de 20 dentes classificados de acordo com a gravidade da EH, seguido pela análise qualitativa e quantitativa das imagens geradas pelo OCT. A análise qualitativa revelou diferenças visuais distintas entre o esmalte afetado e não afetado, enquanto a análise quantitativa permitiu a avaliação estatística das características das imagens, destacando diferenças significativas entre os grupos de severidade da HMI. (38)

#### **6.2.4 Artigo publicado**

O artigo “Use of Optical Coherence Tomography for Differential Diagnosis of Severity of Molar Incisor Hypomineralization (MIH)”, publicado na revista *Journal of Dentistry for Children*, em 2023, pelos autores Áyla Natalia Ferezin, Bianca Caroline Gomes, Maria Lívia Rodrigues de Oliveira, Vicente Silva Mattos, Francisco José de Queiroz Thomé, Alexandra Mussolino de Queiroz, Francisco Wanderley Garcia de Paula-Silva e Fabrício Kitazono de Carvalho, apresenta uma avaliação inovadora do uso da tomografia de coerência óptica (OCT) para o diagnóstico diferencial da severidade da HMI. O estudo empregou análises qualitativas e quantitativas das imagens geradas pelo OCT em dentes afetados por HMI, revelando diferenças visuais distintas entre o esmalte afetado e não afetado, bem como diferenças significativas nas características das imagens entre os grupos de severidade da HMI. Os resultados destacam a eficácia do OCT na diferenciação entre o esmalte íntegro e o esmalte afetado pela hipomineralização, bem como na avaliação da severidade da hipomineralização, demonstrando o potencial do processamento de imagem e das técnicas de análise de textura como métodos úteis para auxiliar no diagnóstico da HMI.

#### **6.2.5 Demais resultados do projeto e perspectivas futuras**

O artigo “*Optical Coherence Tomography (OCT) and Gray Scale Digital Analysis as Non-invasive Techniques for Evaluating Molar-Incisor Hypomineralization (MIH) Severity: A Comparative Study with Microcomputed Tomography*” também relacionado com os resultados das análises por OCT foi publicado na revista *Microscopy Research and Technique*. (39)

Este artigo apresenta um estudo comparativo sobre o uso de técnicas não invasivas, como a Tomografia de Coerência Óptica (OCT) e a Análise Digital em Escala de Cinza, para avaliar a gravidade da Hipomineralização Molar-Incisiva (HMI), em comparação com a Tomografia Computadorizada de Microestrutura (microCT). Neste foram analisadas 33 amostras de dentes com diferentes graus de

Hipomineralização. Os resultados mostraram que a OCT e a análise digital em escala de cinza são técnicas promissoras para avaliar a HMI, mas a microCT ainda é considerada o padrão ouro para avaliação da estrutura dental. Conclui-se que a OCT e a análise digital em escala de cinza podem ser usadas como métodos complementares para avaliar a HMI, mas ainda são necessárias mais pesquisas para validar essas técnicas.

Um terceiro artigo irá relacionar os dados já obtidos, com os resultados para os dados de espectroscopia Raman e de fluorescência. O mesmo deverá ser submetido para revisão no próximo mês.

### **6.3 Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia**

#### **6.3.1 Resultados das análises por espalhamento Raman**

A análise por espectroscopia Raman dos dentes humanos irradiados e reirradiados por radioterapia revelou alterações significativas na composição dos tecidos dentários. Os resultados indicaram uma variação nas áreas totais dos espectros, nas áreas e intensidades dos picos de interesse. Tais alterações sugerem mudanças na estrutura e composição dos dentes devido aos efeitos da radioterapia.

Na Figura 22 são apresentadas as médias dos espectros coletados por espalhamento Raman para cada uma das regiões dos dentes [Esmalte Coronário na face Vestibular (EC\_Vest), Esmalte Coronário na face Lingual/Palatina (EC\_Lin), Fundo de Sulco (FS), Ponta de Cúspide (PC), Junção Amelodentinária na face Vestibular (JAD\_Vest) e Junção Amelodentinária na face Lingual/Palatina (JAD\_Lin)], para cada um dos grupos de amostras (NI – não irradiado, RR30 – reirradiados até 30Gy, RR40 – reirradiados até 40Gy e RR50 – reirradiados até 50Gy). Podemos perceber pelas análises das curvas que temos uma variação muito grande dos espectros de acordo com a quantidade de radiação a qual as amostras foram submetidas. Na Figura 23 podemos ver a tendência de aumento da área total sob o espectro em relação à acumulação de radiação em cada grupo de amostra para cada região analisada.

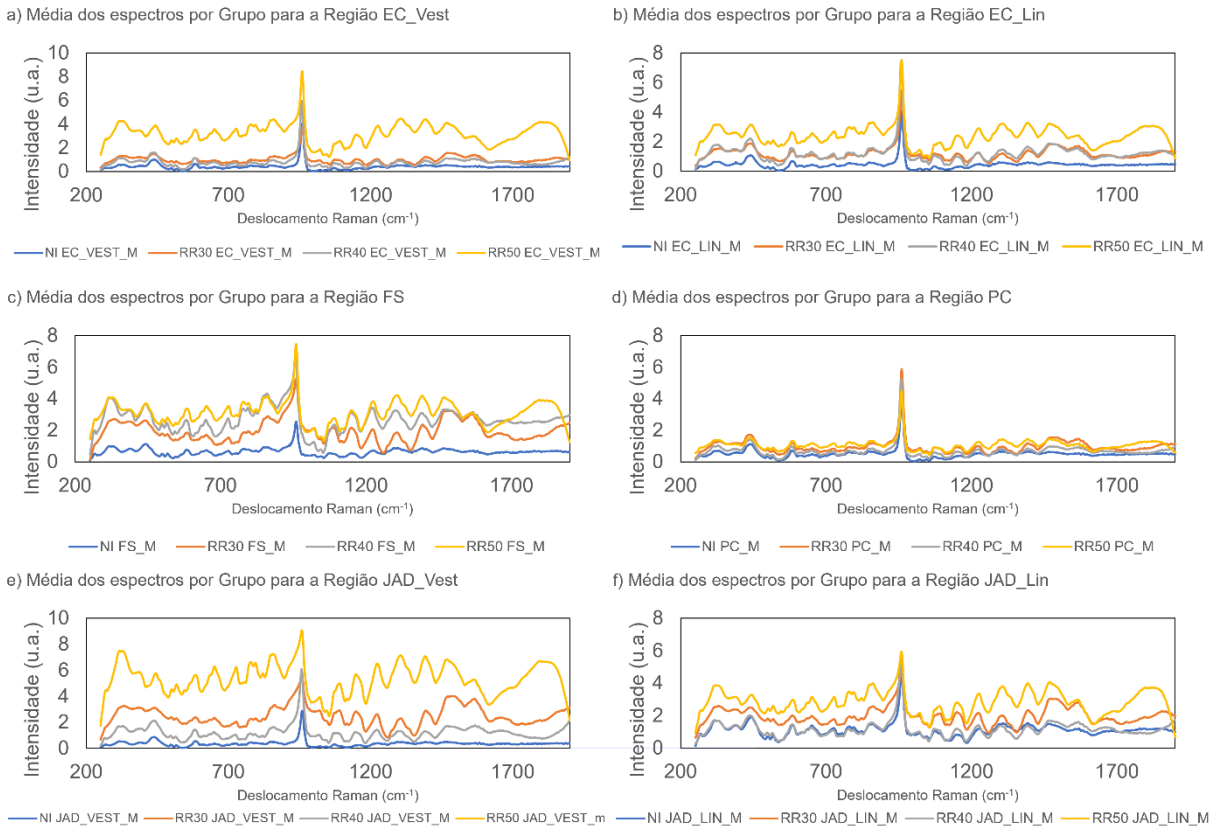
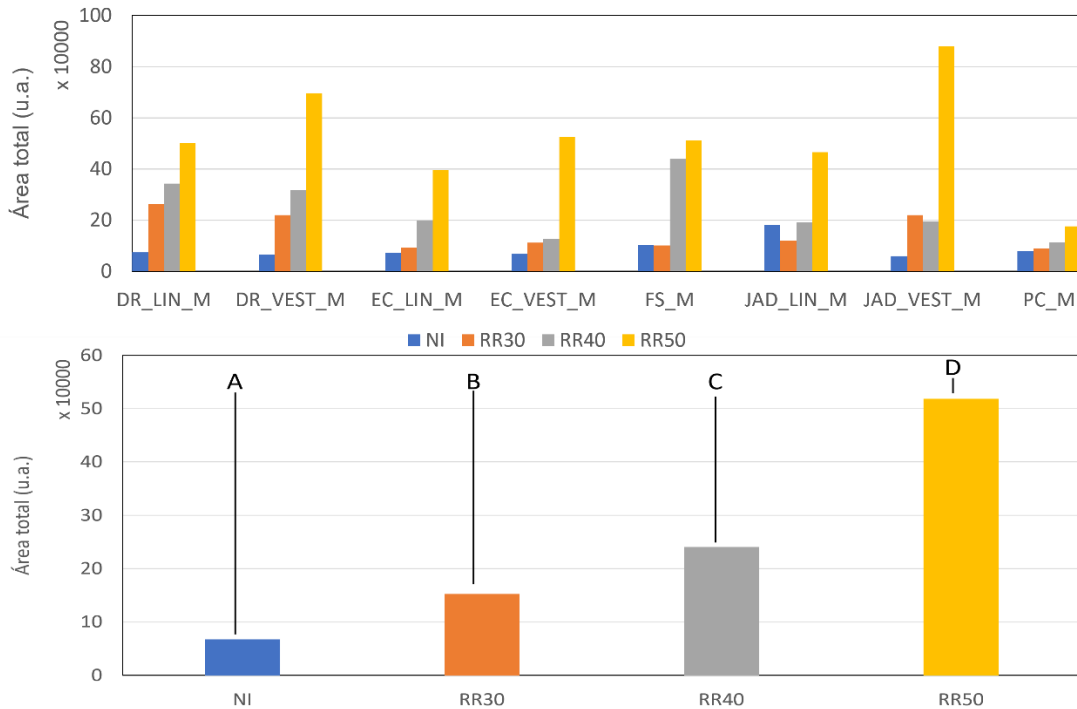


Figura 22 - Espectros Raman para a média de cada grupo de análise. a) análise da região EC\_Vest. b) análise da região EC\_Lin. d) análise da região FS. e) análise da região PC. e) análise da região JAD\_Vest. f) análise da região JAD\_Lin

Fonte: Elaborada pelo autor.



Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos de amostras; nível de significância de 5%

Figura 23 - Áreas totais sob os espectros da Figura 22 para cada um dos grupos de amostras. Fonte: Elaborada pelo autor.



Especificamente, observou-se um aumento na relação carbonato/fosfato com o acúmulo de sessões de radioterapia, o que sugere uma maior suscetibilidade à desmineralização dos dentes expostos à radioterapia em meio ácido. O resultado das análises desta razão estão na Figura 24.

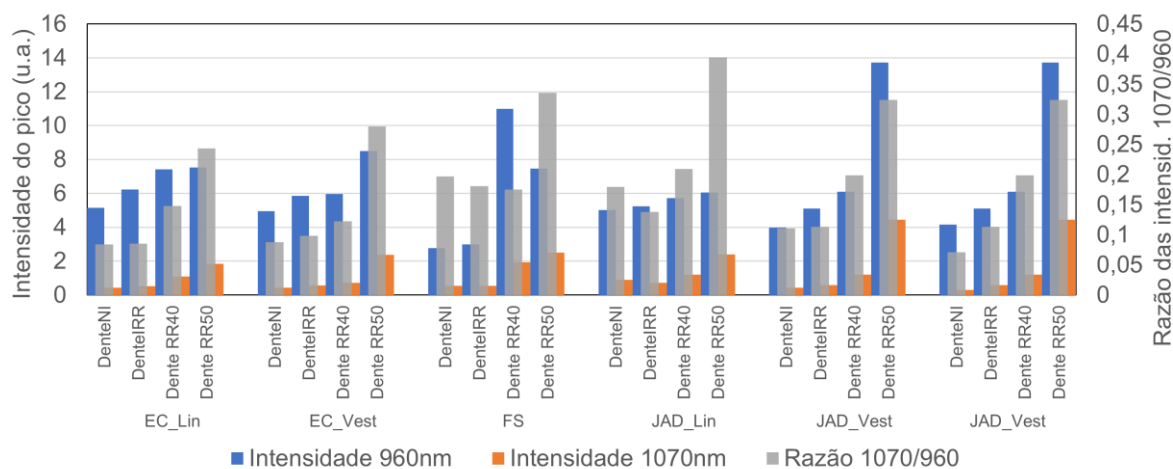


Figura 24 - Resultado das análises por Raman para os picos em  $960\text{ cm}^{-1}$  (fosfato) e  $1070\text{ cm}^{-1}$  (carbonato) assim como a razão entre eles. Pode-se observar o aumento desta razão para os dentes que receberam maior quantidade de radiação (picos à direita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora os espectros Raman não forneçam resultados quantitativos, eles permitiram estimar as variações em relação às amostras não irradiadas, evidenciando as alterações cumulativas causadas pela radioterapia. Esses achados ressaltam a importância de estudos adicionais para compreender de forma mais abrangente as alterações provocadas pelas sessões de radioterapia e suas implicações para a saúde bucal dos pacientes.

### 6.3.2 Resultados das modificações observadas nas imagens de MEV

As principais observações obtidas a partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDX) incluem alterações morfológicas progressivas tanto no esmalte quanto na dentina, com o escalonamento das doses de radiação. No esmalte, as análises morfológicas revelaram a degradação dos prismas e regiões interprismáticas, enquanto na dentina, observou-se o colapso da estrutura dentinária, com a impossibilidade de identificar os túbulos dentinários e as fibras colágenas. Além disso, por meio da análise química quantitativa, observou-se um aumento na porcentagem de oxigênio e diminuição nas porcentagens de fósforo e cálcio tanto no esmalte quanto na dentina após a reirradiação dos espécimes. Esses resultados evidenciam as alterações significativas causadas pela irradiação nos tecidos dentários, fornecendo insights importantes sobre os efeitos da reirradiação nos dentes permanentes. (31)

### 6.3.3 Análises estatísticas performadas

Diversas análises estatísticas foram empregadas para avaliar os efeitos da radioterapia nos tecidos dentários. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov–Smirnov para verificar a distribuição normal. Em seguida, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5% para todas as análises. Além disso, a análise estatística dos dados numéricos obtidos permitiu demonstrar a consistência das alterações observadas, fornecendo insights sobre a relevância das mudanças identificadas. Essas análises estatísticas foram fundamentais para a compreensão dos efeitos da radioterapia nos tecidos dentários, fornecendo suporte quantitativo para os resultados obtidos por meio das diferentes técnicas de análise utilizadas no estudo. (31)

#### **6.3.4 Artigo publicado**

Os relevantes resultados deste trabalho foram sumarizados no artigo “*The effects of re-irradiation on the chemical and morphological properties of permanent teeth*”. Com a autoria de Thais Tedeschi Santos, Vicente Silva Mattos, Kelly Fernanda Molena, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Harley Francisco de Oliveira, Juliana Jendiroba Faraoni, Paulo Nelson Filho, Jarbas Caiado de Castro Neto, Regina Guenka Palma-Dibb e Alexandra Mussolino de Queiroz, o artigo foi publicado na revista “*Radiation and Environmental Biophysics*”. (40)

### **6.4 Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico**

#### **6.4.1 Resultados das análises por espalhamento Raman e MEV/EDX**

Os resultados obtidos por espectroscopia Raman revelaram informações significativas sobre as amostras analisadas. Os espectros processados mostraram os picos de interesse, destacando as características das amostras de dentina convencional. Além disso, os espectros de todas as amostras obtidas foram analisados, fornecendo dados relevantes para a compreensão das propriedades estruturais e composicionais das amostras.

Na Figura 25 podemos ver a área total dos espectros para dentina (a) e esmalte (b) de cada um dos três grupos de amostra. Podemos ver que a área total varia entre os grupos. Quando comparamos o esmalte, vemos que a área total do grupo controle é menor que os outros dois grupos. Entretanto, observando as barras para a dentina, vemos que a área para o grupo controle está maior que do tratamento convencional e menor que a do grupo hipofracionado.

Por outro lado, quando analisamos as áreas individuais de cada um dos picos de interesse, vemos que a mesma é maior para as modalidades Hipofracionada e Convencional, quando comparados ao grupo controle. A Figura 26 demonstra estes resultados, tanto para a análise das áreas dos picos no esmalte (a) quando na dentina

(b). Como mostrado pela análise estatística, não foi verificada diferença significativa entre os grupos de amostras.

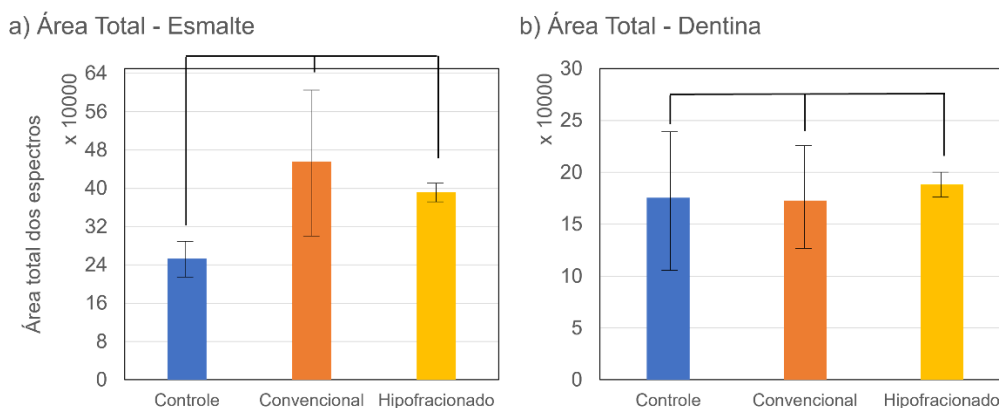


Figura 25 - Áreas totais dos espectros para as amostras, em relação ao esmalte (a) e na dentina (b) nas três condições: controle, convencional e hipofracionado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

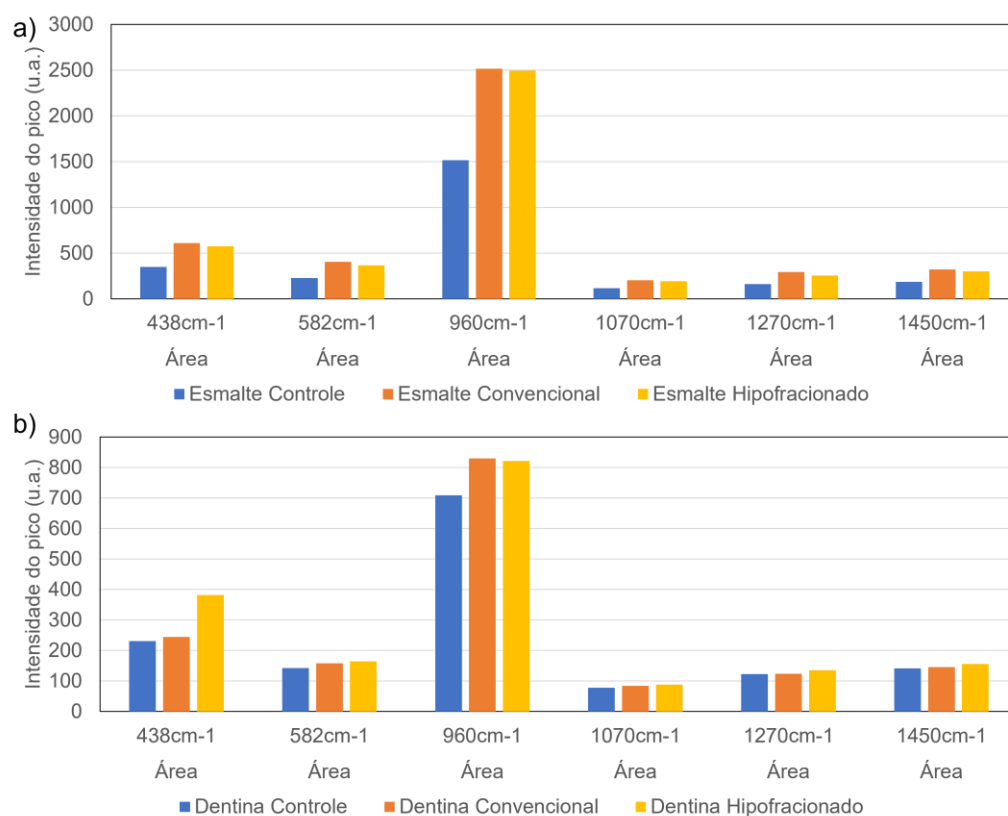


Figura 26 - Área dos picos de interesse para as regiões analisadas nas modalidades controle, tratamento convencional e tratamento hipofracionado. Em a) estão os resultados para o esmalte. b) áreas dos picos para a dentina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas análises da razão carbonato/fosfato vemos que as amostras deste estudo não segue exatamente a mesma tendência apresentada nos demais trabalhos. Quando analisamos a razão das áreas dos picos (Figura 27a) vemos que os grupos de amostra parecem apresentar a mesma tendência de aumento da razão com a quantidade de radiação total, e o mesmo ocorre com o esmalte. Na análise das

intensidades (Figura 27b) podemos observar um aumento gradual na razão quando comparamos o grupo controle para a dentina, em relação aos outros dois grupos. Entretanto, a barra de erro para as amostras torna a diferenças entre grupos indistinguíveis.

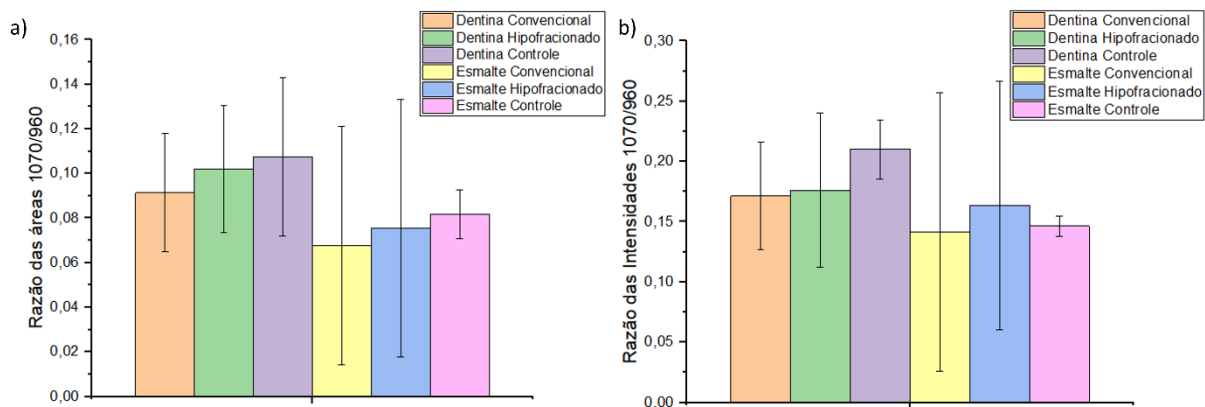


Figura 27 - Análise da razão carbonato/fosfato para cada grupo de amostra nas modalidades controle, convencional e hipofracionado. Em a) áreas dos picos e razão de áreas. b) intensidade dos picos e razão das intensidades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma provável razão para este comportamento diferente dos observados nos demais trabalhos, assim como constatado na literatura é o fato de a quantidade de amostras para tal foi extremamente reduzida (apenas 16 unidades), com grupos de amostras com apenas 2 unidades para definição de tendências ou médias. Portanto, novas análises desta modalidade são necessárias para uma melhor definição da tendência de desmineralização dos dentes e efeitos das modalidades de radiação sobre as amostras, na determinação por espectroscopia Raman.

Os valores obtidos pelas análises por EDX para os elementos presentes na dentina, como oxigênio, fósforo e cálcio, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, evidenciando a uniformidade das propriedades químicas das amostras. Esses resultados fornecem insights importantes para a compreensão da composição e estrutura da dentina, contribuindo para o avanço do conhecimento na área. (41)

#### 6.4.2 Resultados das análises estatísticas feitas

Foram realizadas análises estatísticas abrangentes para avaliar as diferenças entre os grupos de amostras. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar a porcentagem de cálcio, fosfato e oxigênio entre os grupos, tanto no esmalte quanto na dentina. Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, conforme evidenciado pelos valores de  $p > 0,05$ . Essa abordagem estatística robusta permitiu uma avaliação precisa das variações nos elementos químicos presentes nas amostras, fornecendo uma compreensão mais aprofundada da composição e estrutura das mesmas. Essas análises estatísticas desempenharam um papel

fundamental na validação dos resultados obtidos por meio das técnicas de espectroscopia utilizadas, contribuindo significativamente para a interpretação dos dados e para a confiabilidade dos achados. (41)



## **7 DISCUSSÕES**

### **7.1 Projeto Raman e Irradiação por femtossegundo em dentes sadios**

Esses resultados demonstram coletivamente as significativas mudanças químicas e morfológicas no esmalte irradiado por laser de femtossegundo, fornecendo informações valiosas sobre as potenciais aplicações do laser de femtossegundo na odontologia. (37)

Também podemos adicionar que a análise dos espectros Raman pela metodologia aqui descrita forneceu bons insights sobre a composição mineral dos dentes e como elas se alteram com processos físicos (ablação por laser femtossegundo). Ao examinar a relação carbonato/fosfato, observou-se uma diminuição dessa proporção após a exposição ao laser (Figura 16). Este achado sugere que os dentes submetidos à irradiação apresentam uma menor propensão à desmineralização em comparação com os dentes não irradiados. Vale ressaltar que o aumento da relação carbonato/fosfato é indicativo de maior desmineralização do tecido, enquanto a sua redução sugere um processo de remineralização do dente. Essa tendência para uma menor desmineralização nos dentes irradiados destaca o potencial benéfico da irradiação a laser na preservação da saúde dental. (21,37)

### **7.2 Projeto de investigação da Hipomineralização em dentes**

Os resultados obtidos para este projeto destacam a complexidade das alterações, enfatizando que embora os espectros não forneçam resultados quantitativos precisos sobre os compostos presentes, as análises de áreas e intensidades dos picos sugerem variações significativas, variando de acordo com a presença ou ausência de defeito devido à Hipomineralização Molar-Incisiva (HMI) nos dentes.

A observação do aumento na relação carbonato/fosfato (Figura 20), quando comparamos as regiões saudáveis dos dentes em relação à região com defeito, sugere uma maior desmineralização nas áreas afetadas pela HMI, o que explica as modificações observadas a olho nu e demais implicações da condição nos dentes afetados.

Esses resultados de combinação de diferentes técnicas físicas para análise de dentes. Em especial, este estudo comparativo demonstra que a OCT e a Análise Digital em Escala de Cinza apresentam potencial como métodos complementares para avaliar a gravidade da HMI, através da diferenciação entre o esmalte íntegro e o esmalte afetado pela condição, bem como na avaliação da severidade da mesma. Além disso, os resultados destacam a promessa do processamento de imagem e das técnicas de análise de textura como métodos úteis para auxiliar no diagnóstico da HMI.

Os resultados indicam que essas técnicas podem diferenciar a HMI do esmalte e quantificar a gravidade da condição. No entanto, a Tomografia Computadorizada de

Microestrutura (microCT) ainda é considerada o padrão ouro para avaliação da estrutura dental.

Portanto, embora a OCT, a análise digital em escala de cinza, espectroscopia Raman e de fluorescência mostrem promessa, são necessárias mais pesquisas para validar completamente essas técnicas e sua aplicabilidade clínica na avaliação da HMI.

### **7.3 Projeto Raman na análise de efeitos de reirradiação por Radioterapia**

Este estudo avaliou os efeitos da reirradiação nas propriedades do esmalte e da dentina de dentes permanentes humanos, por meio da análise de espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios X. Os resultados indicaram que a reirradiação ocasionou alterações químicas e morfológicas progressivas nas estruturas do esmalte e da dentina, com o escalonamento das doses de radiação. A análise dos espectros de Raman permitiu inferir que as alterações geradas pela radiação sobre a composição dos dentes são diretamente proporcionais à dose administrada e, portanto, mais severas após a reirradiação (Figura 24). Os espectros também indicaram alteração das áreas e dos picos de interesse, demonstrando que as alterações na estrutura e na composição química do esmalte são progressivas e proporcionais ao aumento das doses de radiação.

Além disso, os resultados mostraram que a reirradiação provocou uma variação em relação aos níveis de energia vibracional das moléculas presente no esmalte dentário e, conseqüentemente, mudanças nos parâmetros espectrais como: intensidade, posição e largura dos picos Raman.

Em resumo, neste estudo formado pela colaboração IFSC/FORP, podemos concluir que a reirradiação provoca alterações significativas nas propriedades do esmalte e da dentina de dentes permanentes humanos, com efeitos progressivos e proporcionais ao aumento das doses de radiação. A espectroscopia Raman se mostrou uma técnica eficaz para avaliar essas alterações, permitindo a análise de parâmetros espectrais como intensidade, posição e largura dos picos Raman. Os resultados indicam a importância de se considerar os efeitos da reirradiação na saúde bucal dos pacientes submetidos a tratamentos oncológicos, bem como a necessidade de se desenvolverem estratégias para minimizar esses efeitos.

### **7.4 Projeto Raman em dentes permanentes após modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico**

De forma geral, este trabalho destaca a importância dos resultados obtidos por espectroscopia Raman na análise das propriedades estruturais e composicionais das amostras de esmalte e dentina. A análise dos espectros revelou informações significativas sobre as modificações na composição mineral das amostras, em relação à razão Carbonato/Fosfato. Não há uma demonstração clara da redução ou aumento



significativo para as amostras entre as diferentes modalidades de radioterapia em comparação com o grupo controle.

Além disso, através da análise por MEV e EDX, foi possível a observação de alterações estruturais, como o efeito melting, especialmente no grupo submetido ao tratamento hipofracionado, evidenciado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados também indicaram que não foram observadas micro rachaduras na superfície em áreas oclusais, e apontaram para a necessidade de estudos adicionais para avaliar o impacto do tratamento hipofracionado no condicionamento ácido do esmalte superficial. (41)



## 8 CONCLUSÕES

Ao comparar os resultados dos projetos desenvolvidos para esta tese, alguns pontos em comum e diferenças notáveis emergem, destacando a complexidade das alterações nos tecidos dentários em resposta a diferentes condições experimentais.

Os projetos compartilham da mesma abordagem analítica com foco na técnica de espectroscopia Raman para investigar as mudanças químicas nos tecidos dentários. Essa técnica proporcionou uma visão detalhada das variações na composição, permitindo a identificação de alterações moleculares sutis. Além disso, todos os projetos utilizaram das mesmas análises para validar e quantificar as diferenças observadas, conferindo rigor científico aos resultados.

As diferenças surgem nas condições específicas de cada projeto. Por exemplo, no projeto de Raman e Irradiação por Femtossegundo em Dentes Sadios, as modificações propostas são sugestões para se proteger os dentes, e reduzir efeitos que a perda dos compostos minerais podem ocasionar nos tecidos. Já no projeto de Investigação da Hipomineralização, as análises apontaram para a desmineralização dos dentes conforme a gravidade da condição. No projeto da análise de efeitos de reirradiação por radioterapia, as mudanças foram associadas aos efeitos da radioterapia, concluindo-se que as doses superiores de radiação afetam tanto a composição quanto a morfologia dos dentes. Já no projeto em dentes permanentes após a modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico, as análises estatísticas não revelaram diferenças significativas na composição química entre os grupos.

A razão carbonato/fosfato, um indicador importante da saúde dentária e relacionado diretamente com a desmineralização dos tecidos, foi abordada em diferentes contextos nos projetos, como ponto de análise central das amostras. Na análise das modificações por irradiação por laser femtossegundo, foi possível a observação da redução dessa razão quando comparada aos dentes sem tratamento. Já nas análises dos dentes apresentando Hipomineralização ou submetidos à reirradiação por radioterapia, a razão foi maior nos dentes com estas modificações, quando comparados aos dentes sadios.

Em resumo, os projetos compartilham a abordagem analítica, mas as nuances específicas dos procedimentos experimentais conduzem a resultados distintos. A análise por espectroscopia Raman se mostrou relevante e interessante de ser utilizada como fonte de informações sobre os dentes. Entretanto, uma abordagem com uso de diversas técnicas associadas permite a avaliação de múltiplos parâmetros para uma compreensão abrangente das mudanças nos tecidos dentários em diversas condições.

### 8.1 Perspectivas Futuras

O diagnóstico de alterações no conteúdo mineral em dentes pode ser uma porta aberta a novas técnicas que se propõe a tão. Neste trabalho utilizamos a espectroscopia Raman para tal. Ela se apresenta como potente e capaz de ser

aplicada diretamente nas amostras, mas estudos de aplicação direto desta técnica in vivo se fazem necessária. Também se faz necessária a análise de outras condições que afetam os dentes, que podem ser estudadas sob a luz das técnicas físicas disponíveis para melhor caracterização de defeitos e modificações na saúde oral de pacientes.

Além disso, o desenvolvimento de sondas ópticas flexíveis e portáteis para análise in vivo de tecidos dentários destaca o potencial da espectroscopia Raman para aplicações clínicas. Em suma, o trabalho apresenta uma abordagem inovadora e promissora para a análise de tecidos dentários, contribuindo para o avanço das práticas experimentais na área e fornecendo uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias de pesquisa e aplicação clínica

## REFERÊNCIAS

- 1 SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2. ed. Sao Paulo: Editora Unesp, 2008.
- 2 LYON, L. A. *et al.* Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 341R-361R, 1998. DOI: 10.1021/a1980021p.
- 3 COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. Vibrational and rotational spectra. *In*: COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. New York: Academic Press, 1975. p. 1–68.
- 4 CLARK, R. J. H.; DINES, T. J. Resonance Raman spectroscopy, and its application to inorganic chemistry: new analytical methods (27). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25 n. 2, p. 131–158, 1986. DOI:10.1002/anie.198601311.
- 5 DE FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONCALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Quimica Nova**, v. 20, n. 3, p. 319, 1997
- 6 LONG, D. A. **The Raman effect**: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules. New York: John Wiley , 2002. DOI:10.1002/0470845767.
- 7 LANGER, J. *et al.* Present and future of surface-enhanced Raman scattering. **ACS Nano**, v. 14, n. 1, p. 28–117, 2019. DOI:10.1021/acsnano.9b04224 .
- 8 BYRNE, H. J. *et al.* Spectral pre and post processing for infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 7, p. 1865–1878, 2016. DOI:10.1039/c5cs00440c.
- 9 BARRERA-ORTEGA, C. C. *et al.* Study of demineralized dental enamel treated with different fluorinated compounds by Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Physics and Engineering**, v. 10, p. 635-644, 2020. DOI: 10.31661/jbpe.v0i0.2003-1089.
- 10 BUCHWALD, T.; OKULUS, Z.; SZYBOWICZ, M. Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection-new insights. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. 8, p. 1094–1102, 2017. DOI:10.1002/jrs.5175.
- 11 AKKUS, A. *et al.* A portable fiber-optic raman spectrometer concept for evaluation of mineral content within enamel tissue. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 2, p. e238, 2017. DOI: 10.4317/jced.53185.
- 12 CHANG, N.-Y. N. *et al.* Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4  $\mu\text{m}$  on surface morphology, permeability, and acid resistance. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 49, n. 10, p. 913–927, 2017. DOI:10.1002/lsm.22700.

- 13 CHEN, H. *et al.* Femtosecond laser for cavity preparation in enamel and dentin: ablation efficiency related factors. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. DOI: 10.1038/srep20950.
- 14 ZECELL, D. M. *et al.* Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 31–35, 2009. doi:10.1002/lsm.20738.
- 15 WEERHEIJM, K. L. *et al.* Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 110-113, 2003.
- 16 SARMENTO, L. C.; REZENDE, K. L.; ORTEGA, S. L. O. O impacto da hipomineralização molar incisivo na qualidade de vida de crianças brasileiras. **Revista de Odontopediatria Latinoamericana**, v. 12, 2022. DOI: 10.47990/alop.v12i1.1.
- 17 ALMULHIM, B. Molar and incisor hypomineralization. **Journal of the Nepal Medical Association**, v. 59, p. 295-305, 2021. DOI: 10.31729/jnma.6343.
- 18 WEERHEIJM, K. L. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. **Dental Update**, v. 31, n. 1, p. 9-12, 2004. DOI: 10.12968/denu.2004.31.1.9.
- 19 SHAH, F. A. High-resolution Raman spectroscopy reveals compositional differences between pigmented incisor enamel and unpigmented molar enamel in *Rattus norvegicus*. **Scientific Reports**, v. 13, p. 12301, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-38792-5.
- 20 FARAH, R., *et al.* Linking the clinical presentation of molar-incisor hypomineralisation to its mineral density. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 353–360, 2010. DOI:10.1111/j.1365-263x.2010.01061.x.
- 21 ANNEROTH, G.; HOLM, L.-E.; KARLSSON, G. The effect of radiation on teeth. **International Journal of Oral Surgery**, v. 14, n. 3, p. 269–274, 1985. DOI: 10.1016/s0300-9785(85)80038-7.
- 22 ARID, J. *et al.* Radiotherapy impairs adhesive bonding in permanent teeth. **Supportive Care in Cancer**, 2019. DOI:10.1007/s00520-019-04782-5.
23. BAKER, D. G. (1982). The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation: a review. **Archives of Otolaryngology: head and neck surgery**, v. 108, n. 1, p. 21–24. DOI: 10.1001/archotol.1982.00790490023005.
- 24 Douchy, L. *et al.* The effect of therapeutic radiation on dental enamel and dentin: a systematic review. **Dental Materials**, v. 38, n. 7, 2022, p. e181-e201, 2022. DOI: 10.1016/j.dental.2022.04.014.
- 25 MARTA, G. N. *et al.* Intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: systematic review and meta-analysis. **Radiotherapy and Oncology**, v. 110, n. 1, p. 9-15, 2014. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.11.010.

26 BULATOV, V. *et al.* Dental enamel caries (Early) diagnosis and mapping by laser Raman spectral imaging. **Instrumentation Science & Technology**, v. 36, p. 235–244, 2008.

27 FRASER, S. J. *et al.* A Raman spectroscopic study of teeth affected with molar-incisor hypomineralisation. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 2, p. 202–210, 2015. DOI:10.1002/jrs.4635.

28 KURAMOCHI, E.; IIZUKA, J.; MUKAI, Y. Influences of bicarbonate on processes of enamel subsurface remineralization and demineralization: assessment using micro-Raman spectroscopy and transverse microradiography. **European Journal of Oral Sciences**, v. 124, n. 6, p. 554–558, 2016. DOI: 10.1111/eos.12301.

29 BRAGA, S. R. M. *et al.* Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 12, p. 1083–1087, 2011. DOI:10.1002/jemt.20998.

30 MATTOS, V. S. **Desenvolvimento de nanoestruturas em superfície metálica (prata) com laser pulsado femtossegundo para aumento de fluorescência**. 2019. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos,. Universidade São Paulo, São Carlos, 2019. DOI:10.11606/D.76.2019.tde-23092019-091358.

31 SANTOS, T. T. **Influência da reirradiação nas propriedades químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

32 TIMCHENKO, E. V. *et al.* Analysis of tooth tissues using Raman spectroscopy. **Journal of Physics: conference series**, v. 769, p. 012047, 2016. DOI:10.1088/1742-6596/769/1/012047 .

33 LI, J. *et al.* Background removal from polarized Raman spectra of tooth enamel using the wavelet transform. **Journal of Raman Spectroscopy**, 42(4), 580–585, 2010. DOI:10.1002/jrs.2761 .

34 REED, R. *et al.* Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 5, p.690–697, 2015. DOI:10.1016/j.archoralbio.2015.02.020.

35 CASTRO-E-SILVA, O. *et al.* Autofluorescence spectroscopy in liver transplantation: preliminary results from a pilot clinical study. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 3, p. 722–725, 2008. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.03.005.

36 TSUGE, A. T. *et al.* Study of laser fluorescence spectroscopy in livers of rats with hypothermic ischemia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 38, p. e386023, 2023. DOI: 10.1590/acb386023.

37 CASARIN, H. H. *et al.* Chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel using subablative parameters. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 10, p. 2399-2408, 2021. DOI: 10.1002/jemt.23795.

38 FERREZIN, Á. N. *et al.* Use of optical coherence tomography for differential diagnosis of severity of molar incisor hypomineralization (MIH). **Journal of Dentistry for Children**, v. 90, n. 3, p. 130-138, 2023. PMID: 38123930

39 DE OLIVEIRA, M. L. R. *et al.* Optical coherence tomography and gray scale digital analysis as noninvasive techniques for evaluating molar-incisor hypomineralization severity: A comparative study with microcomputed tomography. **Microscopy Research and Technique**, 1–12. <https://doi.org/10.1002/jemt.24558>

40 DOS SANTOS, T.T., MATTOS, V.S., *et al.* The effects of re-irradiation on the chemical and morphological properties of permanent teeth. **Radiat Environ Biophys** (2024). <https://doi.org/10.1007/s00411-024-01068-1>

41 CONSIGLIERI, R. S. **Propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes após modalidade hipofracionada do tratamento radioterápico**. 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

42 MATTOS, V. S. *et al.* Metal enhanced fluorescence using nanostructures on silver formed with Ti: sapphire femtosecond pulsed laser. **Proceedings of SPIE**, v. 11268, 2020. DOI:10.1117/12.2545963.

43 MATTOS, V. S. *et al.* Functionalization of nanostructured surfaces for optical sensor platforms. **Proceedings of SPIE**, v. 1257212, 2023. DOI: 10.1117/12.2664866.

44 BARRERA-PATIÑO, C. P. *et al.* Light interaction with natural photonic crystal from band gap structure to possible light localization phenomena. **Photonics and Nanostructures: fundamentals and applications**, v. 52, 2022, DOI: 10.1016/j.photonics.2022.101089.

45 BARRERA-PATIÑO, C. P. *et al.* Skin microvasculature determined using OCT angiography: first evidence of its relation with aging. **Laser Physics Letters**, v. 20, n. 2, p. 025602-1-025602-6, 2023. DOI:10.1088/1612-202X/acb1ac.



## **APÊNDICE A – Funcionalização de superfícies nanoestruturadas para desenvolvimento de plataformas para sensores ópticos**

O período inicial do doutorado foi usado, além de para completar disciplinas, para a criação de artigo baseado no projeto desenvolvido no período de mestrado. O trabalho desenvolvido foi apresentado na Conferência SPIE LASE 2020 (San Francisco, CA, US, e gerou o artigo publicado com o título “Metal enhanced fluorescence using nanostructures on silver formed with Ti: Sapphire femtosecond pulsed laser”. Estes resultados foram empregados na continuidade deste projeto, agora no doutorado. (42)

O desenvolvimento deste projeto foi apresentado no processo de qualificação com o título “Funcionalização de superfícies nanoestruturadas para desenvolvimento de plataformas para sensores ópticos”.

Além disso, o mesmo projeto foi apresentado na conferência SPIE Optics + Optoelectronics, 2023, Prague, Czech Republic, 24-28 de abril de 2023, com o título “Functionalization of nanostructured surfaces for optical sensor platforms”. (43)

No âmbito do meu processo de qualificação no doutorado, desenvolvi uma abordagem inovadora para atender à crescente demanda por técnicas avançadas de detecção de moléculas de interesse em diversas áreas. Este esforço foi motivado pelo surgimento constante de novas moléculas com formas e aplicações distintas, a necessidade de diagnosticar novas doenças e a busca por métodos mais sensíveis para detectar moléculas em concentrações mínimas.

Este trabalho assume a forma de uma plataforma versátil para a detecção de moléculas em quantidades ínfimas, utilizando nanoestruturas de prata geradas por meio de laser pulsado femtossegundo. Essas nanoestruturas, configuradas de maneira única, têm a capacidade de amplificar a superfície de contato. A escolha da prata como material para essas superfícies é fundamentada em suas propriedades, incluindo os efeitos de plasmon de superfície que possibilitam o aumento da fluorescência pelo processo de MEF (Metal Enhanced Fluorescence), decorrente da proximidade de fluoróforos com a superfície.

No processo, as superfícies de prata pura com nanoestruturas foram funcionalizadas pela adição de anticorpos específicos para a spike do vírus SARS-CoV-2 (2019-nCoV). Esses anticorpos foram imobilizados sobre a superfície, e anticorpos secundários (Alexa Fluor™ 633 goat anti-human IgG (H+L)) foram adicionados para a ligação específica aos primários, permitindo a detecção por microscopia de fluorescência. Os experimentos preliminares revelaram a eficácia da detecção da ligação entre o anticorpo primário e o secundário, mesmo em concentrações extremamente baixas do primário (0,0525 ng/μL).

Além disso, ao comparar as regiões com nanoestruturas e as regiões lisas da prata, observou-se um aumento significativo do sinal, aproximadamente 6,3 vezes maior. Isso indica não apenas a detecção de traços vestigiais da amostra (com concentração de anticorpo na ordem de ng/μL), mas também uma amplificação do sinal quando comparado a regiões sem a presença da nanoestrutura. Esses

resultados destacam a eficácia da abordagem desenvolvida e sua promissora aplicabilidade em diversas áreas de pesquisa.

Durante o período do meu doutorado sanduíche em Bielefeld, Alemanha, ocorrido de fevereiro a agosto de 2023, participei ativamente das atividades de pesquisa no Laboratório de Biologia Molecular e Nanociências (BINAS), vinculado ao Bielefeld Institute for Biophysics and Nanoscience. Essa experiência foi essencial para a continuidade do meu trabalho de tese e minha formação como cientista.

Logo após minha chegada, integrei-me às reuniões regulares do grupo de pesquisa, apresentando meu projeto e planos para a estadia. Recebi treinamento em avançadas técnicas de análise, com ênfase na microscopia de localização de moléculas únicas, permitindo-me localizar fluorescentes com precisão superior a 20 nm. Além disso, fui introduzido ao Prof. Andreas Hütten para colaboração em utilização de feixe de íons focalizado na preparação de marcadores fiduciais para correlações entre microscopia óptica e eletrônica.

Explorando múltiplas técnicas, adquiri conhecimentos em espectroscopia Raman, microscopia de tempo de vida de fluorescência e espectromicroscopia de espalhamento de luz ultrarrápida, proporcionando uma compreensão abrangente da composição e comportamento das moléculas nas nanoestruturas. O Professor Dr. Thomas Huser sugeriu a análise adicional por espectromicroscopia de emissão de fotoelétrons (PEEM), aproveitando os esperados comportamentos de hot spot das nanoestruturas.

Paralelamente às atividades de pesquisa, dediquei-me ao aprendizado do idioma alemão, alcançando o nível A2.2. Esta imersão cultural aprimorou minha comunicação e integração no ambiente acadêmico. Minhas atividades foram discutidas regularmente com o Prof. Huser e membros do grupo, resultando em valiosos dados coletados em minhas nanoestruturas, ainda em fase de análise

## **APÊNDICE B – Localização de Anderson em cristais fotônicos naturais**

### **Envolvidos:**

Claudia Patricia Barrera Patiño, Vicente Silva Mattos, Camila Paula D’Almeida, Éverton Lucas de Oliveira, Lucas Orlandi de Oliveira, Jarbas Caiado de Castro Neto, Vanderlei Salvador Bagnato

### **Descrição do projeto:**

O projeto foi realizado em parceria inicial entre o estudante, Vicente S Mattos e a Pós Doutoranda Claudia, do Grupo de Óptica/CEPOF (IFSC/USP) com o objetivo de se medir fenômenos ópticos que poderiam ser medidos em amostras biológicas.

As amostras utilizadas foram das borboletas *Morpho cypris* e *Greta oto*, assim como da cigarra brasileira, *Quesada gigas*. A primeira análise sugerida pelo próprio aluno, com iniciativa do mesmo de realizar os procedimentos, foi a de medida do atraso de pulsos pela amostra. Esta medida foi realizada através do set-up experimental desenvolvido pelo estudante com uso do Laser Pulsado Femtossegundo, o mesmo utilizado no trabalho de doutorado, e um autocorrelator (Single Shot Autocorrelator – SSA from Coherent). Com esta montagem, foi possível fazer a medida da alteração da largura do pulso gerado pelas amostras inseridas nos caminhos ópticos do laser dentro do SSA.

Além desta análise, foram feitas montagens experimentais para medida da alteração da fase do laser através de interferometria. O interferômetro utilizado para as medidas foi também montado pelo estudante e demais participantes do trabalho. Estas medidas forneceram base de sustentação para os efeitos ópticos apresentados.

O resultado deste projeto foi publicado com o título “Light interaction with natural photonic crystal from band gap structure to possible light localization phenomena” por Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications. (44)



## **APÊNDICE C – Análise de vasos sanguíneos por OCT**

### **Envolvidos:**

Claudia Patricia Barrera Patiño, Vicente Silva Mattos, Lucas Orlandi de Oliveira, Michelle Barreto Requena, Mirian Denise Stringasci, Jarbas Caiado de Castro Neto, Vanderlei Salvador Bagnato

### **Descrição do projeto:**

Projeto em desenvolvimento para análise de vasos sanguíneos superficiais na pele de 100 voluntários de 20 à 70 anos. Objetivamos o desenvolvimento da correlação entre envelhecimento do indivíduo e os reflexos que este processo causa na pele, principalmente em relação à quantidade de vasos, densidade e diâmetro médio dos mesmos. Parâmetros esses relacionados com a irrigação das regiões envelhecidas da pele.

O resultado deste projeto foi publicado com o título “Skin microvasculature determined using OCT angiography: first evidence of its relation with aging” por Laser Physics Letters. (45)