

Paola Gomes Souza

**Análise da composição química do fluido crevicular gengival  
em dentes com hipersensibilidade dentinária através das  
espectroscopias ATR-FTIR e Raman.**

*“Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in  
dentin hypersensitivity”*

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Odontologia da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do Título  
de Mestre em Odontologia na Área de  
Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia  
2018

Paola Gomes Souza

**Análise da composição química do fluido crevicular gengival  
em dentes com hipersensibilidade dentinária através das  
espectroscopias ATR-FTIR e Raman.**

*“Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin  
hypersensitivity”*

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia, Área de Clínica  
Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares  
Coorientadores: Prof. Dr. Robinson Sabino Silva  
Prof. Dr. Fabio Franceschini Mitri

Banca Examinadora:  
Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares  
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola  
Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Uberlândia  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- S729a  
2018 Souza, Paola Gomes, 1991  
Análise da composição química do fluido crevicular gengival em dentes com hipersensibilidade dentinária através das espectroscopias ATR-FTIR e Raman : spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin hypersensitivity / Paola Gomes Souza. - 2018. 55 f. : il.
- Orientador: Paulo Vinícius Soares.  
Coorientador: Robinson Sabino Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.187>  
Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Dentina - Teses. 3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - Teses. 4. Análise Espectral Raman - Teses. I. Soares, Paulo Vinícius. II. Silva, Robinson Sabino. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº336– COPOD

Data: 26/02/2018

Discente: Paola Gomes Souza Matrícula: 11612ODO007

Título do Trabalho: *Análise da composição química do fluido crevicular gengival em dentes com hipersensibilidade dentinária através das espectroscopias ATR-FTIR e Raman*

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Biomecânica aplicada à odontologia

As **treze horas e trinta minutos** do dia **vinte e seis de fevereiro do ano de 2018** no Anfiteatro do Bloco 4T, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2018, assim composta: Professores Doutores: Adriano Mota Loyola (UFU); Márcio Mateus Beloti (FORP/USP); e Paulo Vinícius Soares (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Paola Gomes Souza**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dr. Paulo Vinícius Soares apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

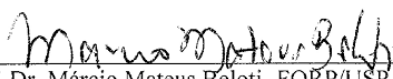
A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a arguir o (a) candidato (a). Após a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

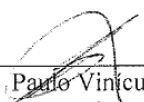
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) Aprovado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola - UFU

  
Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti- FORP/USP

  
Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares - UFU  
Orientador (a)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

**Á DEUS,**

Pela força espiritual e bênçãos nessa caminhada, que contribuíram na concretizaram deste trabalho e permitiram mais um passo no sonho da carreira docente.

**Ao meu anjo da guarda e Tia,**

Em memória de Marli Gomes, por seu incentivo e apoio em minha formação profissional, pois aqueles que nos amam nunca nos deixam de verdade.

**Á minha família, Eurípedes Souza, Marilene Gomes e Rhaila Gomes,**

Meus queridos pais e amada irmã, pela fonte inesgotável de afeto, dedicação e pela educação a mim concedida. Aos demais familiares por todo carinho e confiança em minha trajetória.

**Ao meu companheiro de vida Felipe Otávio,**

Meu parceiro nos caminhos pessoais e profissionais e querido namorado, pela compreensão de meus objetivos e solidariedade inefável.

## AGRADECIMENTOS

Ao prezado, orientador **Prof. Dr. Paulo Vinicius Soares** pela valorosa contribuição em meu crescimento pessoal e profissional como graduanda e mestranda, e oportunidades a mim concedidas, pelo o qual guardo grande apreço e carinho.

Aos estimados, coorientadores **Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva e Prof. Dr. Fabio Franceschini Mitri e Professores integrantes da banda de qualificação e defesa**, pelos conhecimentos compartilhados e valiosa colaboração no mérito dessa produção.

A todos admirados, **Professores do Programa de Pós graduação da Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal de Uberlândia os quais seus ensinamentos e admiração me motivam a seguir essa brilhante trajetória.

Às singulares, **Equipe de ensino, pesquisa e extensão LCNC, Equipe de Fisiologia Integrativa**, nas pessoas de **Emília Aguiar e Priscila Agustinha**, as quais a parceria e experiências vividas marcaram sobremaneira essa caminhada. Pelas amizades construídas e pela cooperação nesse projeto.

Aos queridos, **Amigos da vida, e aos colegas de mestrado** os quais o companheirismo e a convivência se tornarão saudosas e belíssimas lembranças.

Aos inesquecíveis, **Pacientes do centro de tratamento de hipersensibilidade dentinária e LCNC**, que se voluntariaram a participar dessa pesquisa. E demais indivíduos que são atingidos por essas condições, os quais as queixas e necessidades motivaram ao delineamento e execução desse projeto.

A infraestrutura e apoio, dos **Laboratórios e Órgãos de fomento**, Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular da FOUFU e ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do INFIS-UFU nas pessoas de **Guilherme de Lima e Prof. Dra. Anielle Christine**, CNPQ e FAPEMIG. Que viabilizaram a execução desse trabalho e concretização dessa produção.

A formidável, **Universidade Federal de Uberlândia e a Faculdade de Odontologia** que tornaram realidade os sonhos sonhados até aqui e que hoje me oportunizam a janela que vislumbro em um novo horizonte.

## EPÍGRAFE

***“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”***  
*Eleanor Roosevelt*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2. PROPOSIÇÃO .....	20
3. CAPÍTULO 1 .....	22
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS .....	54



# RESUMO

---

## RESUMO

O fluido crevicular gengival (FCG) possui grande potencial para evidenciar mudanças químicas em diferentes estados fisiopatológicos. A hipersensibilidade dentinária (HD) é uma alteração estrutural e sintomática no tecido dentinário cervical gerada por uma etiologia multifatorial. No entanto, alterações químicas deste fluido na HD permanecem indeterminadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química do FCG em dentes com HD comparados a dentes controle através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e da espectroscopia Raman. Foram coletadas 40 amostras de FGC em dentes com HD (n=20) e dentes controle (n=20), utilizando papel absorvente e submetidas à análise de espectroscopia ATR-FTIR e Raman. A análise ATR-FTIR apresentou dez modos vibratórios distintos. Os modos de vibração  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $3020\text{ cm}^{-1}$  identificaram os componentes pectina e lipídio, respectivamente. Esses apresentaram concentrações mais baixas ( $p<0,05$ ) nos dentes com HD em comparação aos dentes controle. Através da espectroscopia Raman, foram identificados oito modos vibracionais. Destes, os picos à  $597\text{ cm}^{-1}$  (amida VI) e a  $622\text{ cm}^{-1}$  (fenilalanina) foram reduzidos ( $p<0,05$ ) nos dentes com HD quando comparados ao controle. Desta forma fica evidenciado que a HD apresenta alterações químicas na composição do FGC. Considerando-se as potenciais funções dos componentes alterados no FGC, podemos sugerir uma redução do mecanismo de proteção biológica do fluido durante a degradação biocorrosiva. Assim, a concentração dos componentes identificados pode ser uma potencial ferramenta para o controle biológico da HD.

**Palavras-chave:** Fluido Crevicular Gengival, Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier, Análise Espectral Raman, Sensibilidade da Dentina.

# **ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

Gingival crevicular fluid (GCF) has great potential to evidence chemical changes in different pathophysiological states. Dentin hypersensitivity (DH) is a structural and symptomatic alteration in the cervical dentinal tissue generated by a multifactorial etiology. However, chemical changes of this fluid in the DH remain undetermined. Therefore, the objective of this study was to evaluate chemical composition of GCF in DH teeth compared to with control teeth through Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) and Raman spectroscopy. 40 samples of GCF from DH (n = 20) and control teeth (n= 20), were collected using absorbent paper and submitted to the ATR-FTIR and Raman spectroscopy analysis. ATR-FTIR analysis presented ten distinct vibrational modes. The vibration modes  $1745\text{ cm}^{-1}$  and  $3020\text{ cm}^{-1}$  identified the pectin and lipid components, respectively. These presented lower concentrations ( $p < 0.05$ ) in the teeth with DH compared to the control. Through Raman spectroscopy were identified eight vibrational modes. The peaks at  $597\text{ cm}^{-1}$  (amide VI) and  $622\text{ cm}^{-1}$  (phenylalanine) were reduced ( $p < 0.05$ ) in the teeth with DH when compared to the control. This evidenced that DH presented chemical changes in the composition of FGC. Considering the potential functions of the altered components in the FGC, we can suggest a reduction of the mechanism of biological protection of the fluid during biocorrosive degradation. Thus, the concentration of the identified components may be a potential tool for the biological control of DH.

**Key words:** Gingival Crevicular Fluid, Spectroscopy, Fourier Transform Infrared, Spectrum Analysis, Raman, Dentin Sensitivity.

# **INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

A hipersensibilidade dentinária (HD) é um quadro doloroso de caráter agudo, provocado, localizado e de curta duração, associado à exposição de tecido dentinário cervical e desencadeado por estímulos mecânicos, térmicos, químicos, elétricos ou osmóticos (Davari *et al.*, 2013; Splietch *et al.*, 2013; Moraschini *et al.*, 2018). O impacto da HD na qualidade de vida da população diz respeito especialmente à seleção dietética, dificuldade na manutenção da higiene dental e impactos estéticos e sociais. Sua prevalência varia de 8 a 74% devido a diferenças nos hábitos alimentares, frequência de higienização e métodos de investigação sujeito a variações (Miglani *et al.*, 2010; Que *et al.*, 2013; Douglas-de-Oliveira *et al.*, 2017), apresentando maior incidência nos indivíduos com idade entre 20 a 40 anos (McGrath *et al.*, 2005; Kenefck *et al.*, 2012). A compreensão molecular do mecanismo doloroso da HD é baseada na “Teoria Hidrodinâmica”. De acordo com essa teoria, os mecanorreceptores na interface polpa-dentina estimulam a condução de estímulos nervosos através de nervos mielinizados para produzir uma resposta dolorosa decorrente de um estímulo prévio (Anderson *et al.*, 1970; Brännström *et al.*, 1981; Bartold *et al.*, 2006). A dor será, portanto, o resultado dos fluxos internos e externos do fluido tubular dentinário.

A HD possui uma etiologia multifatorial baseada na associação de uma tríade de fatores. O primeiro deles é o fator tensional, que constitui-se pelo estresse mecânico resultante das forças aplicadas sobre as superfícies oclusais, desencadeando o acúmulo de tensão na região cervical (proveniente do desajuste oclusal, trauma ou parafunções) (Kornfeld *et al.*, 1932; Benazzi *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015). Já o fator friccional é a perda de substrato induzida por um fluxo de sólidos, líquidos ou gases em constante contato com a estrutura dental; ou mesmo estimulada pela associação da ingestão de alimentos ácidos e posterior escovação com o uso de dentífrícios abrasivos (Cunha-Cruz *et al.*, 2013; Lussi *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2015). E por fim, o fator biocorrosivo o qual caracteriza-se pelas degradações química, bioquímica e eletroquímica da estrutura dentinária, que permitem a perda da camada superficial de esmalte/cimento e a exposição de superfícies dentárias também sujeitas à degradação (Grippio *et al.*, 2004; Grippo 2012; Herpertz-Dahlmann *et*

*al.*, 2015). Devido a esta etiologia multifatorial, o diagnóstico, controle e tratamento da HD são muito discutidos e representam um desafio para o dentista, o que requer o desenvolvimento de estratégias para sua melhor compreensão (Su *et al.*, 2003; Rösing *et al.*, 2009).

O fator etiológico biocorrosão, como mencionado, refere-se à degradação química da estrutura dental, proveniente da ação de ácidos endógenos (proteases, distúrbios gastroesofágicos) (Michael *et al.*, 2009; Stefanski *et al.*, 2014) e ácidos exógenos (hábitos alimentares, exercícios físicos, higiene bucal, estilo de vida), além de poder ser ocasionada por efeitos proteolíticos e piezoelétricos (Lussi *et al.*, 2008; Schlueter *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014). Durante um desafio biocorrosivo, os prótons do agente ácido atacam os componentes da hidroxiapatita- como os íons carbonato, fosfato e hidroxila- resultando na degradação dos cristais dessa estrutura com liberação de íons cálcio (Wiegand *et al.*, 2007). Essa ação contínua dos ácidos remove a camada de superficial de dentina, expondo os túbulos dentinários ao ambiente oral e aumentando o risco de desenvolvimento da HD (Featherstone *et al.*, 2006).

Diante de um processo de degradação corrosiva biológica, os fluidos orais podem apresentar um papel protetor, permitindo a diluição por meio de uma espessa película adquirida, tamponamento de agentes ácidos e supersaturação de componentes neutralizadores (Mandel *et al.*, 1987). Podendo também, em contrapartida, funcionar como modificador no desgaste dentário, relacionado à redução da concentração de seus componentes neutros, diminuição de sua capacidade tamponante e à formação de uma película adquirida mais delgada em contato direto com o dente (Grippio *et al.*, 1991; Young *et al.*, 2002). Sendo portanto, a avaliação destes fluidos na presença dos processos de degradação química uma ferramenta de mister importância na caracterização de quadros de anormalidades resultantes.

O fluido crevicular gengival (FCG), por tratar-se de um fluido oral biológico intersticial presente no sulco gengival e em íntimo contato a junção amelocementária (Kamodyová *et al.*, 2011), também pode correlacionar-se a

estes papéis protetores e modificadores. A constituição desse fluido é resultante da interação entre o biofilme bacteriano aderido à superfície dental e as células do tecido periodontal, derivando-se de uma complexa mistura de substâncias do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais e microrganismos bucais (Chibebe *et al.*, 2008). O FCG apresenta um grande potencial para o monitoramento de estados fisiopatológicos por ser facilmente acessível, sua forma de coleta pode variar desde o uso de pipetas volumétricas microcapilares calibradas, cones de papel, até a aplicação de tiras de papel absorvente estéreis (Shivaprasad & Pradeep, 2013; Jung *et al.*, 2014; Perinetti *et al.*, 2015). As tiras de papel absorvente são consideradas hoje o padrão ouro de sua obtenção, no entanto, sua utilização de maneira direta nos métodos de espectroscopia nunca foi testada (Barros *et al.*, 2016; Smuthkochorn *et al.*, 2017).

Esse método de aquisição não-invasivo, simples, seguro e indolor (Rody *et al.*, 2016) permite que o FCG atue como evidenciador de anormalidades em casos de desequilíbrio ou alteração metabólica. Diante da variação do volume secretado ou mesmo à presença de metabolitos específicos em sua composição (Selvarajan *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2016). Como exemplo, alguns analitos, proteínas e peptídeos foram evidenciados pela literatura na investigação de doenças periodontais (Baesa *et al.*, 2016), remodelação óssea (Jung *et al.*, 2014), reabsorção dental (Rody *et al.*, 2016) e na caracterização do perfil microbiano em quadros de peri-implantites (Wang *et al.*, 2016). Contudo, a composição do FCG nunca foi avaliada na HD, constituindo uma investigação inédita e conferindo embasamento a novos estudos.

Dado os constantes avanços das ciências ômicas (proteômica, metabolômica, genômica e transcriptômica) associadas às técnicas quantitativas na biologia de sistemas, tem-se configurado plataformas importantes para a descoberta de componentes químicos presentes em biofluidos orais que possam indicar anormalidades. Considerando esse contexto, uma alternativa de destaque seriam as técnicas espectroscópicas, as quais destacam-se a Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR) e a Espectroscopia



Raman. Essas técnicas espectroscópicas são o conjunto de métodos de análise que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria, objetivando a obtenção de informações físicas e químicas de uma determinada amostra biológica ou não biológica (Barth *et al.*, 2007).

A espectroscopia ATR-FTIR é notável por permitir a identificação de grupos funcionais químicos com alta precisão através da absorção dessa radiação infravermelha e a variação do estado vibratório e rotacional dos constituintes de determinada amostra (Khaustova *et al.*, 2010; Camerlingo *et al.*, 2014). De forma mais detalhada, esse processo ocorre diante da interação e espalhamento elástico ou inelástico de um fóton com as moléculas da matéria. Esse fóton poderá ganhar ou perder uma quantidade de energia relacionada ao espaçamento da energia vibracional da molécula, que será detectada pelo espectroscópio. A absorção de luz na região infravermelho do espectro eletromagnético proporciona um espectro correspondente aos modos vibracionais específicos que são exclusivos de cada estrutura molecular (Bunaciu *et al.*, 2017). A vibração dos átomos no interior da molécula apresenta energia compatível com a região do espectro eletromagnético correspondente, ou seja, cada componente apresenta uma assinatura específica no espectro (Severcan *et al.*, 2010). Dessa forma, essa avaliação permite a mensuração do comprimento de onda e da intensidade da aquisição de luz infravermelha por uma dada amostra, sendo a luz infravermelha energética suficiente para excitar vibrações moleculares a níveis de energia mais elevados (Cui *et al.*, 2012).

O espectrômetro de absorção no infravermelho contém em sua óptica o interferômetro de Michelson, no qual um divisor separa o feixe de radiação infravermelha emitido em dois, metade desse feixe é direcionado a um espelho fixo e o outro a um espelho móvel. Após a reflexão nos espelhos, ambos os feixes voltam a se combinar e atingem a amostra (Al-Saeed & Khalil, 2009). A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector e gera um interferograma que mostra a intensidade da radiação detectada em função do deslocamento do espelho móvel. Logo após, os dados são processados relacionando a intensidade da banda à sua concentração (Khaustova *et al.*, 2010; Al-Saeed & Khalil, 2012). A aquisição dos espectros gerados pode ser

realizada de variados modos, e dentre esses, por reflexão total atenuada (ATR). As análises espectrais por reflexão são as mais utilizadas, uma vez que os espectros obtidos no ATR não requerem substratos especiais e nenhuma ou pouca preparação da amostra. Necessita-se apenas que o material estudado seja colocado em contato direto com o elemento de reflexão interna, tornando o processo de análise mais rápido e simples (Tatulian *et al.*, 2003). Dessa forma, os modos de vibração gerados por amostras biológicas, como o fluido crevicular gengival, podem ser considerados impressões bioquímicas que podem correlacionar-se com a presença ou ausência de determinado quadro ou condição (Khaustova *et al.*, 2010; Caetano Júnior *et al.*, 2015).

A radiação espalhada pelas moléculas de uma amostra contém fótons com a mesma frequência da radiação incidente, no entanto pode conter também um pequeno número de fótons com a frequência alterada ou deslocada. O processo espectroscópico da medida desses fótons deslocados é chamado de espectroscopia Raman (Sala *et al.*, 1995). Na espectroscopia Raman, quando um espécime é irradiado por uma fonte de luz monocromática, uma pequena fração da luz incidente será difundida com um comprimento de onda maior ou menor daquele comprimento do laser original. Esse deslocamento do comprimento de onda dependerá da estrutura química das moléculas responsáveis pela dispersão (Skoog *et al.*, 2002).

Sendo assim, a espectroscopia Raman caracteriza-se por ser uma espectroscopia de dispersão ou espalhamento da radiação monocromática, ou seja, essa determina a quantidade de energia a ser disseminada por uma dada amostra e sua capacidade de difusão (Horsnell *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012). Informação essa que também pode ser utilizada para detectar mudanças na composição do fluido em nível molecular. O espectro Raman é obtido através da incidência de um laser sobre a amostra biológica e a difusão dessa por monocromadores do espectrômetro, que separam os diversos comprimentos de onda através de suas interferências. O sinal Raman é então coletado por um filtro de rejeição que segrega os sinais baseando-se nas suas diferenças de frequência. Esse sinal é transferido para o espectrógrafo e seus componentes recolhidos por um detector que converte a intensidade da luz em sinais

elétricos, os quais são interpretados em um computador na forma de um espectro Raman (Souza *et al.*, 2003).

Esse processo de espalhamento da espectroscopia Raman pode ser descrito como sendo a transição de uma molécula do estado fundamental para o estado vibracional excitado. Fornecendo, desse modo a composição química das amostras através das vibrações moleculares e os níveis de energia de suas estruturas atômicas e ligações químicas (Fenn *et al.*, 2011). Assim sendo, enquanto a espectroscopia de infravermelho é baseada em efeitos de absorção de luz, a espectroscopia Raman é governada por processos de disseminação da luz pela matéria (Zieba-Palus *et al.*, 2006; Qing *et al.*, 2016). Ou seja, a realização de ambas metodologias constitui-se uma alternativa efetiva e integral para detecção de mudanças na composição do FCG, já que são técnicas complementares e abrangem diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético, que englobam os modos vibracionais associados a importantes componentes bioquímicos.

Portanto, parece oportuno estudar a hipótese de uma expressão diferenciada nos componentes espectrais específicos do FCG em dentes com HD quando comparado a dentes saudáveis. Podendo contribuir para a identificação de componentes do FCG relacionados à inibição de processos corrosivos na estrutura dentária e colaborar para o desenvolvimento de futuros mecanismos de proteção, na manutenção do nível desses compostos no FCG e a consequente redução do dano estrutural no tecido dentinário.

# **PROPOSIÇÃO**

---

## **2. PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo avaliar a composição química do fluido crevicular gengival em dentes com hipersensibilidade dentinária comparando-a com a de dentes controle através da espectroscopia ATR-FTIR e Raman.

# CAPÍTULO I

---

**Artigo:** Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin hypersensitivity.

Artigo a ser enviado para publicação no periódico *Archives of Oral Biology*.

**Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin hypersensitivity**

Paola Gomes Souza, Emília Maria Gomes Aguiar, Priscila Agustinha Neves de Souza, Fabio Franceschini Mitri, Robinson Sabino Silva, Paulo Vinícius Soares.

**Corresponding author:**

Paulo Vinícius Soares, DDS, MS, PhD. Department of Operative Dentistry and Dental Materials. Av. República do Piratini, n/nº, - Campus Umuarama - Bloco 4L, Sala 4L42. Uberlândia - Minas Gerais. ZIP-CODE: 38400-902 – Brazil. E-mail: paulovsoares@yahoo.com.br. Telephone number: 55-34 3218 2255; Fax: 55-34 3218 2279

## **Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin hypersensitivity**

Paola Gomes Souza<sup>a</sup>, Emília Maria Gomes Aguiar<sup>b</sup>, Priscila Agostinha Neves de Souza<sup>c</sup>, Fabio Franceschini Mitri<sup>d</sup>, Robinson Sabino Silva<sup>e</sup>, Paulo Vinícius Soares<sup>f\*</sup>.

<sup>a</sup> DH and NCCL Research Group Member, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [paolagomessouza@gmail.com](mailto:paolagomessouza@gmail.com)

<sup>b</sup> Integrative Physiology and Salivary Nanobiotechnology Group Member, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [mihaguiar@hotmail.com](mailto:mihaguiar@hotmail.com)

<sup>c</sup> School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [souza.pan@outlook.com](mailto:souza.pan@outlook.com)

<sup>d</sup> Institute of Biomedical Sciences Member, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [fmitri05@gmail.com](mailto:fmitri05@gmail.com)

<sup>e</sup> Integrative Physiology and Salivary Nanobiotechnology Group Coordinator, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [robinsonsabino@gmail.com](mailto:robinsonsabino@gmail.com)

<sup>f</sup> DH and NCCL Research Group Coordinator, School of dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil. [paulovsoares@yahoo.com.br](mailto:paulovsoares@yahoo.com.br)

**Running title:** Crevicular fluid composition in dentin hypersensitivity

**Key words:** Gingival Crevicular Fluid, Spectroscopy, Fourier Transform Infrared, Spectrum Analysis, Raman, Dentin Sensitivity.

### **\*Corresponding author**

Paulo Vinícius Soares, DDS, MS, PhD. Department of Operative Dentistry and Dental Materials. Av. República do Piratini, n/nº, - Campus Umuarama - Bloco 4L, Sala 4L42. Uberlândia - Minas Gerais. ZIP-CODE: 38400-902 – Brazil. E-mail: paulovsoares@yahoo.com.br. Telephone number: 55-34 3218 2255; Fax: 55-34 3218 2279

## **Spectral analysis for the characterization of crevicular fluid in dentin hypersensitivity**

### **Abstract**

Gingival crevicular fluid (GCF) has great potential to evidence chemical changes in different pathophysiological states. Dentin hypersensitivity (DH) is a structural and symptomatic alteration in the cervical dentinal tissue generated by a multifactorial etiology. However, chemical changes of this fluid in the DH remain undetermined.

**OBJECTIVE:** Therefore, the objective of this study was to evaluate chemical composition of GCF in DH compared with control teeth through Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) and Raman spectroscopy.

**METHODS:** 40 samples of GCF from DH and control teeth were collected using absorbent paper and submitted to the ATR-FTIR and Raman spectroscopy analysis.

**RESULTS:** ATR-FTIR analysis presented ten distinct vibrational modes, the vibration modes  $1745\text{ cm}^{-1}$  and  $3020\text{ cm}^{-1}$  identified the pectin and lipid components, respectively. These presented lower concentrations ( $p < 0.05$ ) in the teeth with DH compared to the control. Eight vibrational modes were identified by Raman spectroscopy. The peaks at  $597\text{ cm}^{-1}$  (amide VI) and  $622\text{ cm}^{-1}$  (phenylalanine) were reduced ( $p < 0.05$ ) in the teeth with DH when compared to the control.

**CONCLUSION:** In conclusion, the chemical changes in GCF of DH teeth suggests a reduction in the mechanism of biological protection of this fluid during biocorrosive degradation.



## INTRODUCTION

Dentin hypersensitivity (DH) is a painful disease characteristically acute, provoked, localized and short-lived, associated with exposure of cervical dentinal tissue and triggered by tactile, thermal, chemical, electrical or osmotic stimuli.<sup>1,2</sup> DH has impact on people's quality of life especially on their dietary selection, difficulty in maintaining maintenance of dental hygiene and aesthetic and social impacts. Its prevalence varies from 8 to 74% due to differences in eating habits, frequency of hygiene and methods of research which may vary.<sup>3,4</sup> The DH has a multifactorial etiology based on the association of a triad of factors: the accumulation of tension (wear caused by malocclusions, occlusal trauma or parafunctions), the attrition (abrasive wear stimulated by the friction of substances to the dental structure) and the biocorrosive processes (chemical, biochemical and electrochemical degradation of the dentin structure).<sup>5,6</sup> Because of this multifactorial etiology, its diagnosis, control and management are much discussed and represent a challenge to the dentist, requiring the development of strategies for its better comprehension.<sup>7,8</sup>

The biocorrosive etiological factor, refers to the chemical degradation of the dental structure from the action of endogenous and exogenous acids, and caused by proteolytic and piezoelectric effects.<sup>9</sup> As mentioned, the pathogenesis of biocorrosion is related to endogenous (proteases, gastroesophageal disorders) and exogenous (dietary habits, physical exercise, oral hygiene, lifestyle) factors.<sup>10,11,12</sup> In face of a process of biocorrosive degradation, oral fluids can present a protective or modifying role in tooth wear related to the formation of a film acquired in close contact with the tooth, alterations in the concentration of its components and its buffering capacity.<sup>13,14</sup>

The gingival crevicular fluid (GCF), an interstitial biological fluid present within the gingival sulcus, which is located in close contact with the cemento-enamel junction<sup>15</sup> has great potential for monitoring pathophysiological states because it is easily accessible through non-invasive, simple, safe and painless methods.<sup>16</sup> In the case of imbalance or metabolic alteration, this fluid

acts as an evidence of abnormality due to variation of its volume secretion or even the presence of specific metabolites in its composition.<sup>17,18</sup> However, the composition of GCF has never been evaluated in DH. Attenuated total reflectance by Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis is notable for enabling the identification of chemical functional groups with high precision, through the absorption of infrared radiation and variation of the vibrational and rotational state of these constituents.<sup>19,20</sup> The Raman spectroscopy also can be used to detect changes in fluid composition at molecular level, through the scattering of the monochromatic radiation on the sample and its dispersion capacity.<sup>21,22</sup> Thus, these spectral analysis are an alternative to detect changes in GCF composition.

In the present study, was tested the hypothesis that specific spectral components of GCF are differentially expressed in DH compared to healthy teeth. It can contribute to the identification of GCF components related to inhibition of corrosive processes in the dental structure. Thus, the aim of this study was to evaluate chemical composition of GCF in DH comparing with control teeth through ATR-FTIR and Raman spectroscopy.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Selection of samples**

After approval by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (Reference # 2.001.493), 20 patients were selected according to the following inclusion criteria: age group of 20 to 50 years old, complete dentition, similar gingival profile, without periodontitis and good oral hygiene condition. And the exclusion criteria: presence of systemic impairment, to take medication, patients submitted to radiation, pregnant, smokers and alcoholics, due to the changes induced by these conditions in the GCF composition. Two posterior teeth of the same arch of each patient were elected with the following characteristics, respectively: Control tooth (n = 20): teeth without cervical dentin exposure, wear and symptoms and Tooth with DH (n =

20): teeth with signs of dentin exposure (<0,5mm of thickness) and symptoms of short-lived localized acute pain. Totalling the sample of 40 teeth for fluid collection. The diagnosis of DH was performed through stimulation by the air-jet test for 2 seconds in the cervical region and measurement of pain by the visual analog scale.<sup>23</sup>

### **Collection of gingival crevicular fluid (GCF)**

The GCF samples were collected exclusively in the morning (fasted patient without previous hygiene) using sterile absorbent paper strips (Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY). That were inserted 0.5mm into the gingival sulcus on the buccal surface and kept in position for a period of 3 minutes (elapsed time for absorption of the fluid over the entire length of the absorbent paper). Without bleeding, saliva or bacterial plaque contamination with the use of relative insulation (Adapted Protocol).<sup>24</sup> After collection, these samples were stored in eppendorfs and frozen at -80 °C.

### **Chemical profile by ATR-FTIR Spectroscopy**

The samples of absorbent paper containing crevicular fluid were submitted to the Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometer (ATR-FTIR Vertex 70, Bruker Optics, Reinstetten, Germany), which evaluated the interaction of electromagnetic radiation with the different chemical constituents of the GCF, allowing the determination of the present vibrational modes. The crystal material in micro-attenuated total reflectance (ATR) unit was a diamond disc as internal-reflection element. The absorbent paper, without crevicular fluid, spectrum was used as a background in ATR- FTIR analysis. The samples were analyzed in a region of 4000-1000  $\text{cm}^{-1}$  recorded with 32 scans per analysis, 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution and their spectrum recorded.<sup>18</sup>

### **Raman spectroscopy measurements**

The specimens were subsequently subjected to Raman Spectrometer (LabRAM, HR Evolution, HORIBA, France). This method determines the

radiation re-emitted by the samples, vibrational modes found and their chemical assignments. The papers were attached to a pre-fabricated carrier and irradiated by a diode laser source of 785 nm (100 mW before objective). The 100 × air objective (MPLN N.A. 0.9, Olympus), which produced a laser spot of 1 μm, subsequently used to collect Raman signals. The spectra was calculated by the mean of ten measurements at arbitrary locations on the paper strips. The basal correction was performed by the multiple point correction, which was used to stretch the endpoints of the spectrum. All Raman measurements were recorded with 10 minutes, accumulation time in the range of 500-1500 cm<sup>-1</sup>.

### **ATR-FTIR and Raman spectral data analysis**

The spectra were normalized by the vector method and adjusted to the elastic correction of the baseline. The original data of both analysis were distributed Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) to perform the second derivative analysis. The second derivative was obtained through the application of Savitzky-Golay algorithm with polynomial order 5 and 20 window points. In ATR-FTIR spectral analysis, the second derivatives was used and obtained by mean and the levels were calculated by band intensity.<sup>25</sup> The intensity of vibrational modes were obtained using in the Origin Pro 9.0 program (OriginLab, Northampton, MA, USA) and the band areas values generated were used for Raman spectrum calculations.

### **Statistical analysis**

Normality and distribution of the data were analyzed using the Shapiro-Wilk, D'Agostino-Pearson and Kolmogorov-Smirnov tests. Followed by Student's t- test ( $p > 0.05$ ), performed on GraphPad Prism software (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of  $p < 0,05$  were considered significant. The components of the fluid were expressed as mean ± standard deviation (SD).

## RESULTS

The ATR-FTIR spectra of GCF from DH and control teeth were represented in Fig. 1 with a superposition of spectral components. ATR-FTIR analysis of GCF presented ten vibrational modes in original spectra. Vibrational modes assignments of GCF are described in Table 1.<sup>26,27-31</sup> The vibrational mode in original spectra may detected two, or more, analytes with very similar wavenumber. Thus, we performed the second derivative ATR-FTIR analysis to isolate each vibrational mode. The 3337  $\text{cm}^{-1}$ , 3293  $\text{cm}^{-1}$ , 2918  $\text{cm}^{-1}$ , 1538  $\text{cm}^{-1}$ , 1456  $\text{cm}^{-1}$ , 1385  $\text{cm}^{-1}$ , 1316  $\text{cm}^{-1}$  e 1034  $\text{cm}^{-1}$  vibrational modes were similar ( $p > 0.05$ ) in control and DH teeth (Fig. 2a-2h). However, the vibrational modes at 3020  $\text{cm}^{-1}$  and 1745  $\text{cm}^{-1}$  were decreased ( $p < 0.05$ ) in DH compared to control teeth (Fig 3a-3b). The 1745  $\text{cm}^{-1}$  (1761  $\text{cm}^{-1}$  to 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) vibrational mode indicated the stretch C=O (pectin). The vibrational mode with wavelength at 3020  $\text{cm}^{-1}$  (3296  $\text{cm}^{-1}$  to 2993  $\text{cm}^{-1}$ ) indicated the presence of the elongation =C-H (lipids).

Raman spectra was obtained from the same GCF samples in the complementary wavelength range of 500 to 1500  $\text{cm}^{-1}$  to determinate the main vibrational modes identified. In this spectrum, it was possible to highlight several vibrational modes due to the various components of the GCF (Fig. 4). Among the bands range from 650  $\text{cm}^{-1}$  to 500  $\text{cm}^{-1}$ , eight main peaks were identified, as shown in Fig. 5. The Raman spectra peaks and the identification of the respective components are described in Table 2.<sup>32-36</sup> Peaks at 622  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5a) and at 597  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5b) are reduced ( $p < 0.05$ ) in DH teeth as compared with control teeth. These peaks are identified as alpha-amine terminal binding ( $\text{NH}_2$ ; phenylalanine) and C=O group (amide VI), respectively.

## DISCUSSION

This research represents an innovation to characterize the composition of GCF in DH teeth. Besides that, according our knowledge, this is the first study to demonstrate a direct analysis of GCF in absorbent paper by ATR-FTIR and

Raman analysis. In ATR-FTIR spectra, were showed that 3020  $\text{cm}^{-1}$  and 1745  $\text{cm}^{-1}$  vibrational modes of GCF reduced in in DH teeth. These vibrational modes at 3020  $\text{cm}^{-1}$  and 1745  $\text{cm}^{-1}$  were indicated as pectin and lipids, respectively.<sup>26,37</sup> Moreover, the peaks at 622  $\text{cm}^{-1}$  and 597  $\text{cm}^{-1}$  in Raman spectra of GCF decreases in DH teeth. Taken together, the reduction in these vibrational modes suggests that these components can be related to inhibition of corrosive processes in the dental structure. Considering that specific spectral components of GCF were differentially expressed in DH compared to healthy teeth, the results founded in the present study proved the hypothesis tested.

It was considered that chemical degradation of the dentin tissue properties is due to the attack of protons, present in the acidic agents, over the hydroxyapatite components (carbonate, phosphate and hydroxyl ions), which results in the degradation of the hydroxyapatite crystals with the release of calcium ions.<sup>38</sup> Pectin is considered an inhibitor of the biocorrosive potential of acid solutions. In the tooth structure due to its interaction with the hydroxyapatite of the dental surface forming a protective layer capable of reducing the ionic exchanges between the acid solution and the dental substrate.<sup>39,40</sup> When the GCF of DH teeth were compared to control teeth, it was demonstrated that DH teeth reduced pectin as demonstrated by 3020  $\text{cm}^{-1}$  vibrational mode.<sup>26</sup> This data suggests the relation between the reduction of its protective capacity to the ionic exchanges and the presence of a biocorrosive mechanism.

In this way, the GCF could be considered as a modifying factor of DH. In the face of the indication of biocorrosive degradation, changes in its chemical composition, buffering capacity and formation of its acquired pellicle, can contribute to the origin and progression of dentin degradation.<sup>41,42</sup> This acquired pellicle is an amorphous, colorless, homogeneous and acellular membranous salivary layer, with a thickness of 2 to 10  $\mu\text{m}$  in close contact with the dental structure, free of microorganisms, composed of organic (lipids) and inorganic content.<sup>43,44</sup> This layer provides an inherent and intrinsic protection against the action of acids derived from feeding or regurgitation of the gastric content, that is, from the degradation of the dental structure.<sup>45,46</sup> In light of the results of this

study, it is noted that the amount of lipid content in fluid of DH teeth was lower than that observed in GCF the control teeth. This result suggests that a reduced thickness of acquired pellicle and, consequently, the lower concentration of its components contribute to generate a predisposition to the biocorrosive degradation.<sup>47</sup>

As with infrared spectroscopy, it has been possible to prove that Raman spectroscopy can also provide information on vibrational energy levels and molecular structure in samples of the GCF by light scattering by matter.<sup>48,49</sup> Thus, both methodologies become fundamental and make themselves complementary techniques, allowing the evaluation in different vibrational modes and additional peak readings.<sup>32,33</sup> Raman spectroscopy of GCF in DH teeth indicated reduction in the peaks at  $622\text{ cm}^{-1}$  and at  $597\text{ cm}^{-1}$ . These regions correspond respectively to the compounds Phenylalanine<sup>34</sup> and Amide VI<sup>35</sup>.

In the understanding of the relationship between the determined compounds, it is again noted a strong relation of the protection mechanism provided by this fluid to biological corrosive processes in the dental structure. Phenylalanine is one of the main amino acids that constitute proteins that are structurally resistant and stable to changes in conformation.<sup>50</sup> The main physiological role of the proteins, which phenylalanine and proline constitute, is its collaboration in the formation of the acquired pellicle, previously mentioned, contributing to the protection of mucosal surfaces and of teeth.

Because these proteins constituted of phenylalanine e proline present high-density molecules, it is easy to adhere to dental surfaces, so higher the proportion, especially in healthy teeth, greater the probability of structural integrity of dental tissues.<sup>51,52,53</sup>

The theory that best elucidates the cellular and molecular mechanisms of dentin hypersensitivity is the "hydrodynamic theory", which postulates that nociceptive responses may result from the activation of nerve endings in the dentin tubules, due to an increase in osmotic pressure caused by fluid

movements.<sup>54,55</sup> The odontoblasts themselves also has mechanosensitive receptors and voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels, and absorb the mechanical stress caused by these movements of the dentinal fluids. It is therefore involved in the mechanisms of nociceptive signal transduction and acting as sensors of the receiver cells in the hypersensitivity.<sup>56,57</sup> In the present study, through spectroscopy analyzes, it was noticed that DH teeth had lower levels of Amide VI when compared to control teeth. Considering the hydrodynamic theory and the fact that this compound is related to the blockage of the transmission of pain sensation in different regions of the body, especially in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels, this reduction is totally plausible and contributes to the characterization of this painful process.<sup>48,49,58</sup> Thus, it is noted that the compounds found have a strong relationship with the protection mechanism of dentin degradation and, therefore, the symptoms and control of DH and the identification of these compounds can contribute to future mechanisms of protection and reduction of dentinal structural damage.

## CONCLUSION

In conclusion, this study highlighted four vibratory modes in the composition of GCF (1745 cm<sup>-1</sup> and 3020 cm<sup>-1</sup> by the ATR-FTIR spectrum and 622 cm<sup>-1</sup> and 597 cm<sup>-1</sup> using the Raman spectrum), which proved the presence of chemical modifications in the fluid of tooth with DH when compared to the control group. The identified functional groups related with these vibrational modes (Pectin, Lipid, Phenylalanine and Amide VI) suggest a relationship with the mechanism of protection of dentin degradation and its symptomatology. In addition, the data show that the GCF has a great potential to identify structural changes such as DH, which also emphasizes that the ATR-FTIR and Raman spectra can potentially be reliable tools for investigating the characterization of this biological fluid through its direct analysis on absorbent paper, distinguishing between teeth control and DH teeth.



## REFERENCES

1. Davari, A., Ataei, E., & Assarzadeh, H. (2013). Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment; a literature review. *J Dent (Shiraz)*, 14(3), 136-45.
2. Splietch, C.H., & Aikaterini, T. (2013). Epidemiology of dentin hypersensitivity. *Clin Oral Invest*, 17(1), S3-S8. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0889-8>.
3. Que, K., Guo, B., Jia, Z., Chen, Z., Yang, J., & Gao, P. (2013). A cross-sectional study: non-carious cervical lesions, cervical dentine hypersensitivity and related risk factors. *J Oral Rehabil*, 40(1), 24-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2012.02342.x>.
4. Miglani, S., Aggarwal, V., & Ahuja, B. (2010). Dentin hypersensitivity: Recent trends in management. *J Conserv Dent*, 13(4), 218-24. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73385>.
5. Grippo, J.O. (2012). Biocorrosion vs. erosion: the 21st century and a time to change. *Compend Contin Educ Dent [S.I.]*, 33(2), 33-7.
6. Grippo, J.O., Simring, M., & Schreiner, S. (2004). Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*, 135(8), 1109-18. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0369>.
7. Rösing, C.K., Fiorini, T., Liberman, D.N., & Cavagni, J. (2009). Dentine hypersensitivity: analysis of self-care products. *Braz Oral Res*, 23(1), 56-63. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000500009>.
8. Su, J.M., Tsamtsouris, A., & Laskou, M. (2003). Gastroesophageal reflux in children with cerebral palsy and its relationship to erosion of primary and permanent teeth. *Journal of the Massachusetts Dental Society*, 52, 20-24.
9. Michael, J.A., Townsend, G.C., Greenwood, L.F., & Kaidonis, J.A. (2009). Abfraction: separating fact from fiction. *Aust Dent J*, 54, 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.01080.x>.
10. Lussi, A., & Jaeggi, T. (2008). Erosion-diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig*, 12, 5-13. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0179-z>.

11. Soares, P.V., Souza, L.V., Veríssimo, C., Zeola, L.F., Pereira, A.G., Santos-Filho, P.C., et al. (2014). Effect of root morphology on biomechanical behaviour of premolars associated with abfraction lesions and different loading types. *J Oral Rehabil*, 41, 108-14. <https://doi.org/10.1111/joor.12113>.
12. Schlueter, N., Ganss, C., Pötschke, S., Klimek, J., & Hannig, C. (2012). Enzyme activities in the oral fluids of patients suffering from bulimia: a controlled clinical trial. *Caries Res*, 46, 130-9. <https://doi.org/10.1159/000337105>.
13. Grippo, J.O. (1991). Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent*, 3, 14-9. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.1991.tb00799.x>.
14. Young, W.G., & Khan, F. (2002). Sites of dental erosion are saliva-dependent. *J Oral Rehabil*, 29, 35-43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2002.00808.x>.
15. Kamodyová, N., & Celec, P. (2011). Salivary markers of oxidative stress and Salivette collection systems. *Clin Chem Lab Med*, 49(11), 1887-90. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.677>.
16. Rody, W.J.Jr., Wijegunasinghe, M., Holliday, L.S., McHugh, K.P., & Wallet, S.M. (2016). Immunoassay analysis of proteins in gingival crevicular fluid samples from resorbing teeth. *Angle Orthod*, 86(2), 187- 92. <https://doi.org/10.2319/032415-195.1>.
17. Barros, S.P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*, 70(1), 53-64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107>.
18. Selvarajan, S., Perumalsamy, R., Emmadi, P., Thiagarajan, R., & Namasivayam, A. (2015). Association Between Gingival Crevicular Fluid Leptin Levels and Periodontal Status - A Biochemical Study on Indian Patients. *J Clin Diagn Res*, 9(5), ZC48-53. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12335.5941>.
19. Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V., & Tonevitsky, A. (2010). Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy.

- Analyst, 135(12), 3183-92. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>.
20. Camerlingo, C., d'Apuzzo, F., Grassia, V., Perillo, L., & Lepore, M. (2014). Micro-Raman spectroscopy for monitoring changes in periodontal ligaments and gingival crevicular fluid. *Sensors (Basel)*, 14(12), 22552- 63. <https://doi.org/10.3390/s141222552>.
  21. Horsnell, J., Stonelake, P., Christie-Brown, J., Shetty, G., Hutchings, J., Kendall, C., et al. (2010). Raman spectroscopy- a new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes. *Analyst (Lond.)*, 135(12), 3042–3047. <https://doi.org/10.1039/c0an00527d>.
  22. Lin, J., Chen, R., Feng, S., Pan, J., Li, B., Chen, G., Lin, S., et al. (2012). Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy for potential noninvasive nasopharyngeal cancer detection. *J. Raman Spectrosc*, 43(4), 497–502. <https://doi.org/10.1002/jrs.3072>.
  23. Holland, G.R., Narhi, M.N., Addy, M., Gangarosa, L., & Orchardson, R. (1997). Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol*, 24(11), 808-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb01194.x>.
  24. Xiang, X.M., LIU, K.Z., Man, A., Ghiabi, E., Cholakakis, A., & Scott, D.A. (2010). Periodontitis-specific molecular signatures in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res*, 45(3), 345-52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01243.x>.
  25. Lopes, J., Correia, M., Martins, I., Henriques, A.G., Delgadillo, I., da Cruz E Silva, O., et al. (2016). FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through. Analysis of Biological Fluids. *J Alzheimers Dis*, 52(3), 801-12. <https://doi.org/10.3233/JAD-151163>.
  26. Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I.U. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Journal Applied Spectroscopy Reviews*, 33, 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>.
  27. Paluszkievicz, C. & Kwiatek, W.M. (2001). Analysis of human cancer

- prostate tissues using FTIR microscopy and SXIXE techniques. *Journal of Molecular Structure*, 565–566, 329–334. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00527-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00527-0).
28. Dovbeshko, G.I., Gridina, N.Y., Kruglova, E.B., & Pashchuk, O.P. (1997). FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, 53, 233– 246. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00462-8).
  29. Fung, M.F.K., Senterman, M.K., Mikhael, N.Z., Lacelle, S., & Wong, P.T.T. (1996). Pressure-tuning fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. *Biospectroscopy*, 2, 155–165. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1996\)2:3<155::AID-BSPY2>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1996)2:3<155::AID-BSPY2>3.0.CO;2-7).
  30. Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I.U. (2007). Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493-541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.
  31. Sikirzhytski, V., Virkler, K., & Lednev, I.K. (2010). Discriminant analysis of Raman spectra for body fluid identification for forensic purposes. *Sensors (Basel)*, 10(4), 2869-84. <https://doi.org/10.3390/s100402869>.
  32. d'Apuzzo, F., Perillo, L., Delfino, I., Portaccio, M., Lepore, M., & Camerlingo, C. (2017). Monitoring early phases of orthodontic treatment by means of Raman spectroscopies. *J Biomed Opt*, 22(11), 1-10. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.11.115001>.
  33. Virkler, K., & Lednev, I.K. (2010). Forensic body fluid identification: the Raman spectroscopic signature of saliva. *Analyst*, 135(3), 512-7. <https://doi.org/10.1039/B919393F>.
  34. Li, X., Yang, T., & Lin, J. (2012). Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, 17(3), 037003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.3.037003>.
  35. Qiu, S., Xu, Y., Huang, L., Zheng, W., Huang, C., Huang, S., et al. (2016). Non-invasive detection of nasopharyngeal carcinoma using saliva surface-enhanced Raman spectroscopy. *Oncol Lett*, 11(1), 884-890. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3969>.
  36. Feng, S., Huang, S., Lin, D., Chen, G., Xu, Y., Li, Y., et al. (2015). Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors. *Int J Nanomedicine*.

- 12(10), 537-47. <https://doi.org/10.2147/IJN.S71811>.
37. Caetano Júnior, P.C., Strixino, J.F., & Raniero, L. (2015). Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research Biomedical Engineering*, 31(2), 116-124. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>.
  38. Wiegand, A., & Attin, T. (2007). Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond)*, 57, 169–176. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql163>.
  39. Beyer, M., Reichert, J., Heurich, E., Jandt, K.D., Sigusch, & B.W. (2010). Pectin, alginate and gum arabic polymers reduce citric acid erosion effects on human enamel. *Dental Materials*, 26, 831–9. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.008>.
  40. Beyer, M., Reichert, J., Sigusch, B.W., Watts, D.C., & Jandt, K.D. (2012). Morphology and structure of polymer layers protecting dental enamel against erosion. *Dental Materials*, 28(10), 1089-97. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.07.003>.
  41. Hellwig, E., Lussi, A., & Goetz, F. (2013). Influence of human saliva on the development of artificial erosions. *Caries Res*, 47, 553–558. <https://doi.org/10.1159/000351634>.
  42. Magalhaes, A.C., Sener, B., & Attin, T. (2008). Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion caused by different acids. *Acta Odontol. Scand*, 66, 225–230. <https://doi.org/10.1080/00016350802183401>.
  43. Teixeira, E.H., Napimoga, M.H., Carneiro, V.A., de Oliveira, T.M., Nascimento, K.S., Nagano, C.S., et al. (2007). In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. *Journal compilation 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, 103, 1001–1006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03326.x>.
  44. Lendemann, U., Grogan, J., & Oppenheim, F.G. (2000). Saliva and dental pellicle – a review. *Adv Dent Res*, 14, 22–28. <https://doi.org/10.1177/08959374000140010301>.
  45. Yin, A., Margolis, H.C., Yao, Y., Grogan, J., & Oppenheim, F.G. (2005).

- Multi-component adsorption model for pellicle formation: the influence of salivary proteins and nonsalivary phosphoproteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*, 21, 102–110.
46. Yao, Y., Grogan, J., Zehnder, M., Lendenmann, U., Nam, B., Wu, Z., et al. (2001). Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol*, 46, 293–303. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00134-5).
  47. Huang, C.B., George, B., & Ebersole, J.L. (2010). Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of oral biology*, 55(8), 555-60. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.05.009>.
  48. Chioca, L.R., Segura, R.C.F., Andreatini, R., & Losso, E.M. (2010). Antidepressants and local anesthetics: drug interactions of interest to dentistry. *Rev Sul-Bras Odontol*, 7(4), 466-73.
  49. Froes, G.C., Ottoni, F.A., & Gontijo, G. (2010). Topical Anesthetics. *Surg Cosmet Dermatol.*, 2(2), 111-16.
  50. Jung, G.B., Kim, K.A., Han, I., Park, Y.G., & Park, H.K. (2014). Biochemical characterization of human gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement using Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express*, 5(10), 3508-20. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.003508>.
  51. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2006). *Fundamentos de Biologia Celular*. (2th ed.). Rio Grande do Sul: Porto Alegre. (Chapter 7).
  52. Pinheiro, C.E. (1980). *Curso de Bioquímica da Cárie Dental I - Bioquímica da Saliva*. Revista Paulista de Odontologia. Bauru: São Paulo.
  53. Bennick, A., & Cannon, M. (1978). Quantitative study of the Interaction of salivary acidic proline rich proteins with hydroxyapatite. *Caries Res*, 12, 159-164. <https://doi.org/10.1159/000260326>.
  54. Brannstrom, M., & Astrom, A. (1972). The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. *Int Dent J*, 22, 219–227.
  55. Brannstrom, M., Linden, L.A., & Astrom, A. (1967). The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res*, 1, 310. <https://doi.org/10.1159/000259530>.

56. Allard, B., Couble, M.L., Magloire, H., & Bleicher, F. (2000). Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem*, 275, 2556–2561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002327200>.
57. Magloire, H., Lesage, F., Couble, M.L., Lazdunski, M., & Bleicher, F. (2003). Expression and localization of TREK-1 K<sup>+</sup> channels in human odontoblasts. *J Dent Res*, 82, 542–545. <https://doi.org/10.1177/154405910308200711>.
58. Bherwani, C., Kulloli, A., & Kathariya, R. (2014). Zucchelli's technique with subepithelial connective tissue graft for treatment of multiple gingival recessions. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 16, 19.

## TABLES

**Table 1.** ATR-FTIR vibrational modes and chemical assignments of components of the GCF.<sup>26,27-31</sup>

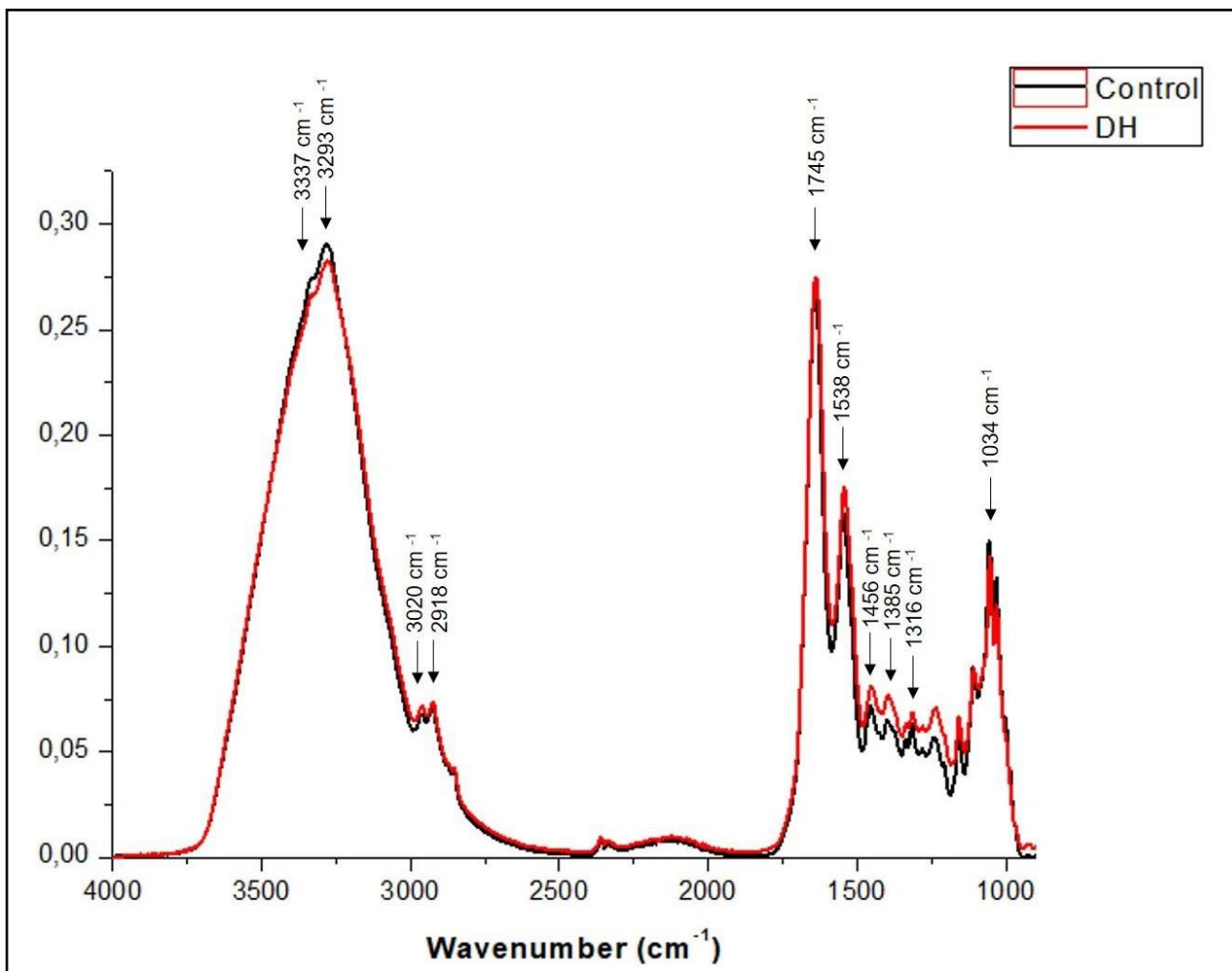
<b><i>Vibrational modes</i></b>	<b><i>Assignments</i></b>
3337 cm <sup>-1</sup>	Stretching N-H asymmetric
3293 cm <sup>-1</sup>	OH stretching (associated)
3020 cm <sup>-1</sup>	Stretching vibration =CH of lipids
2918 cm <sup>-1</sup>	Stretching C-H
1745 cm <sup>-1</sup>	Stretching vibration (C=O) (pectin)
1538 cm <sup>-1</sup>	Stretching C=N, C=C
1455 cm <sup>-1</sup>	Asymmetric CH <sub>3</sub> bending modes of the methyl groups of proteins
1385 cm <sup>-1</sup>	Stretching C-O, deformation C-H, deformation N-H
1316 cm <sup>-1</sup>	Amide III band components of proteins
1034 cm <sup>-1</sup>	Collagen



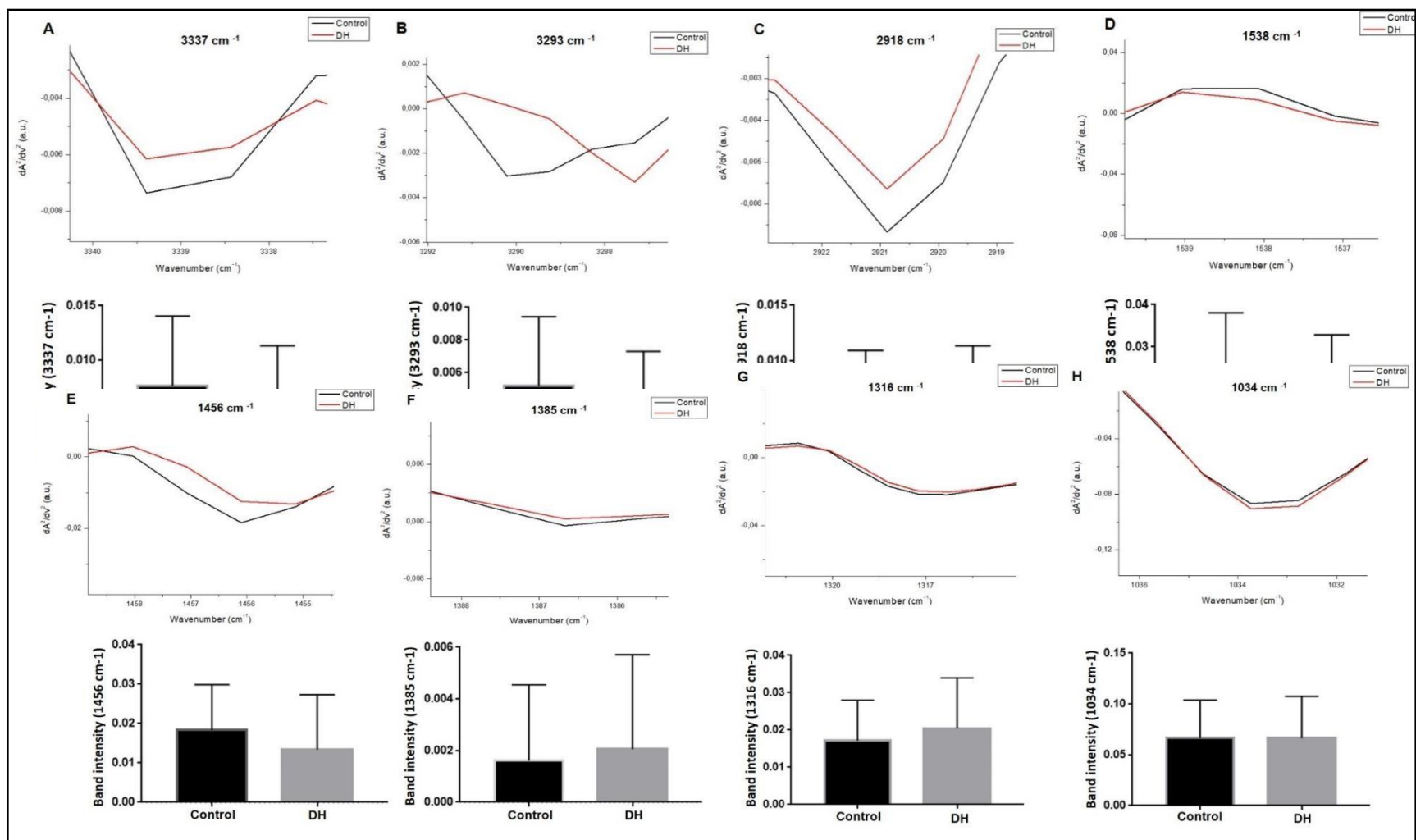
**Table 2.** Raman spectra peaks and the identification of respective components of the GCF.<sup>32-36</sup>

<b><i>Raman spectra peaks</i></b>	<b><i>Components</i></b>
643 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine
635 cm <sup>-1</sup>	Tyrosine
632 cm <sup>-1</sup>	Acetatos
622 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine
621 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine
597 cm <sup>-1</sup>	Amide-VI
544 cm <sup>-1</sup>	C–C3 bending
523 cm <sup>-1</sup>	Lysozymes
521 cm <sup>-1</sup>	Exocyclic vibrations

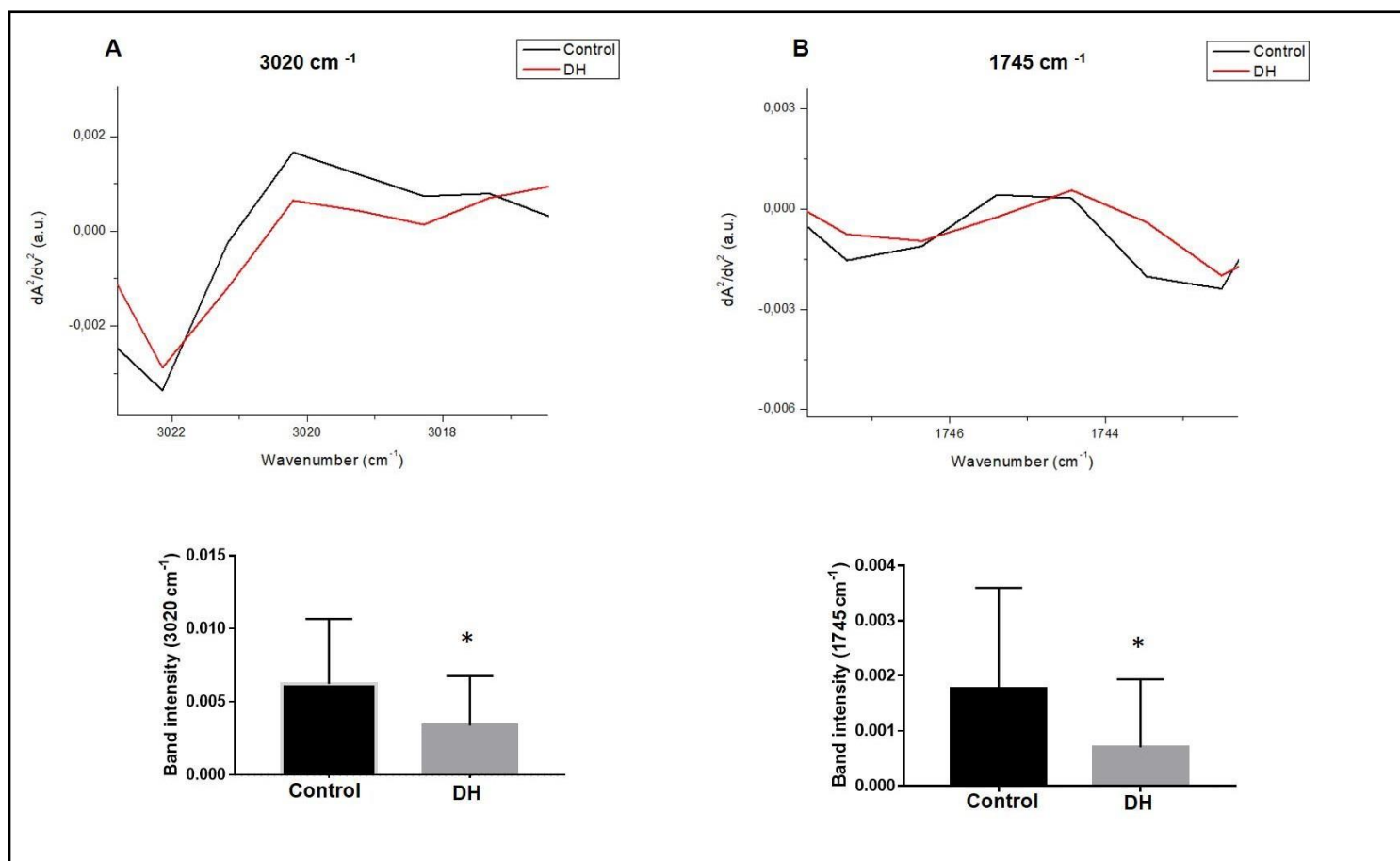
## FIGURES



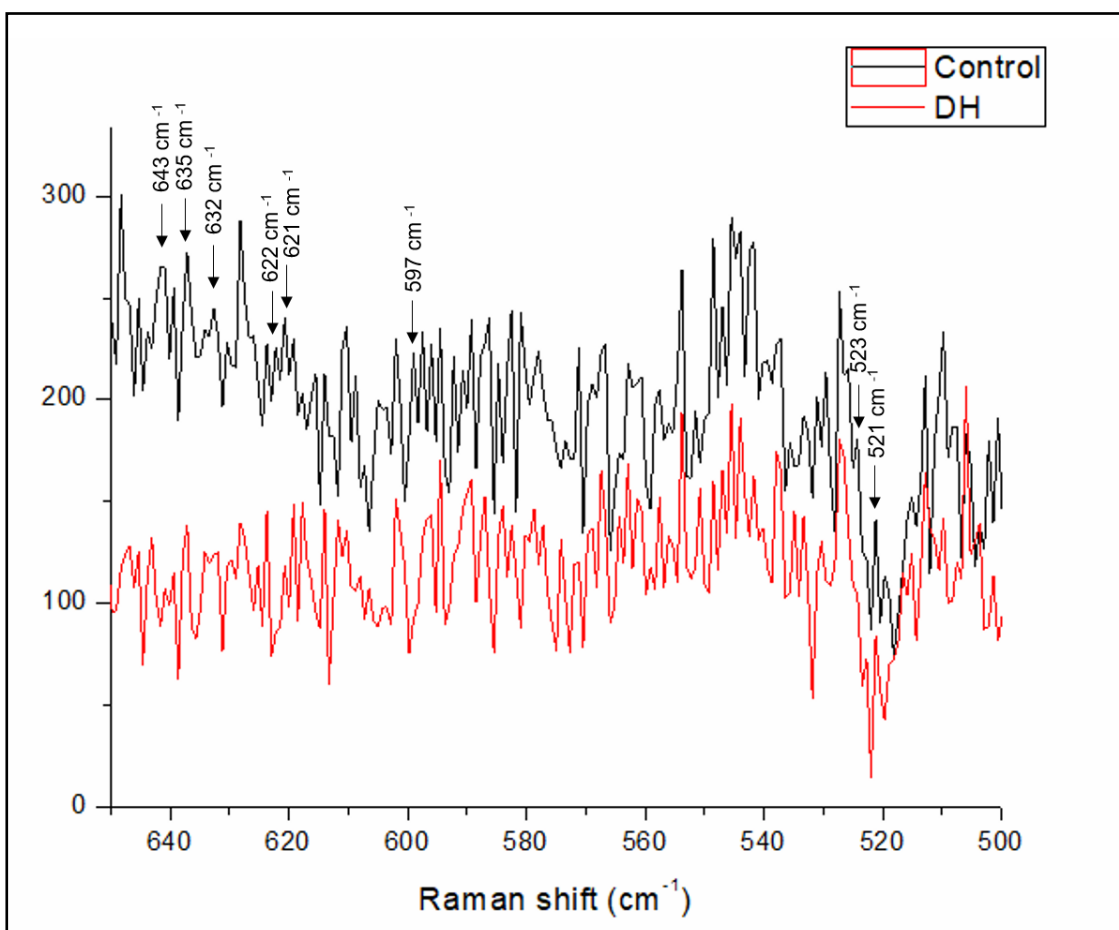
**Figure 1.** Comparison of the ATR-FTIR average spectra (4000-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) of GCF of control teeth (Control) with DH teeth (DH) and identification of the most different vibrational modes.



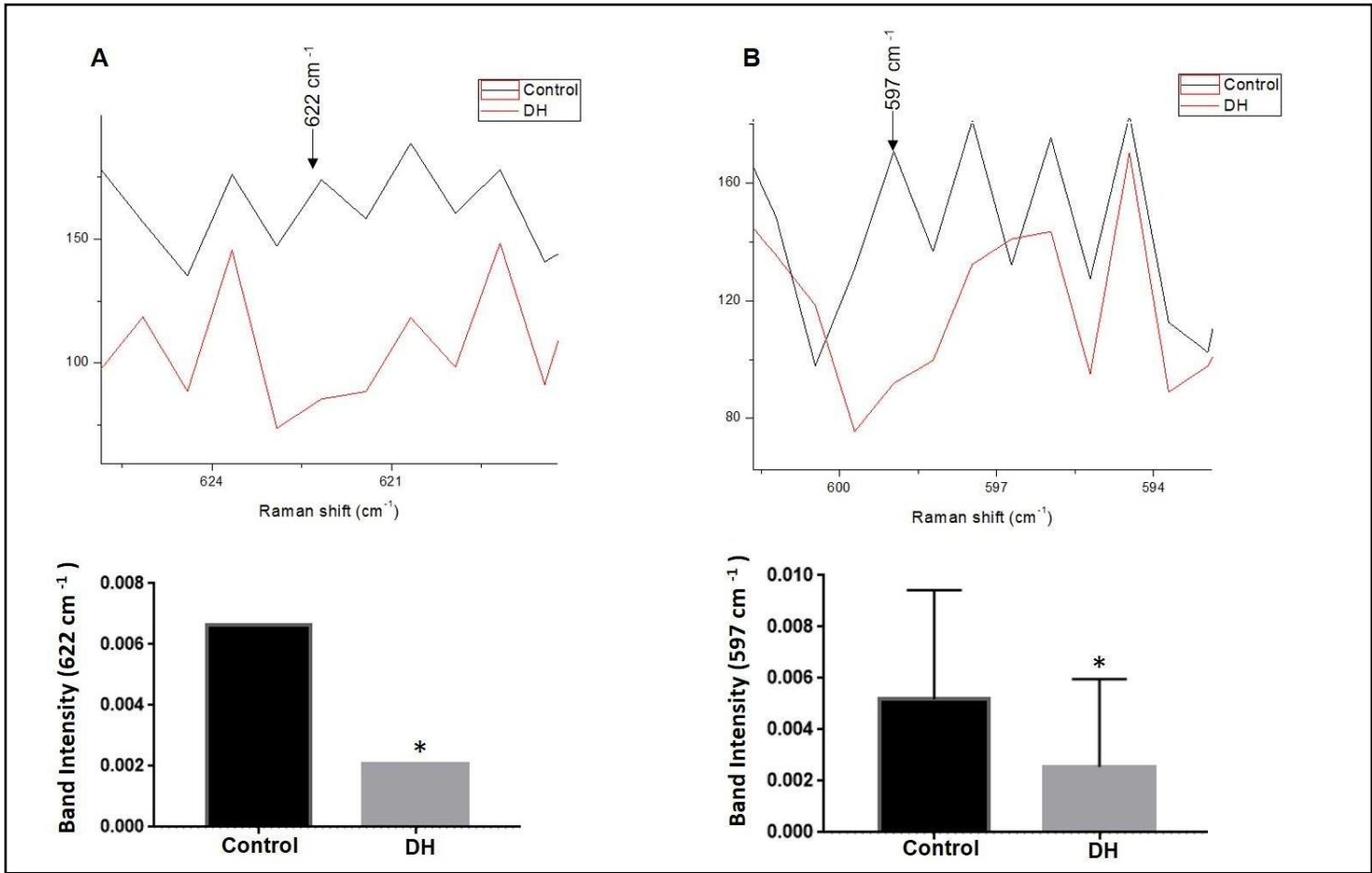
**Figure 2.** Vibrational modes of ATR-FTIR spectra (from 3340 to 1032  $\text{cm}^{-1}$ ) of GCF of control group (Control) and DH teeth (DH) at: 3337  $\text{cm}^{-1}$  (a), 3293  $\text{cm}^{-1}$  (b), 2918  $\text{cm}^{-1}$  (c), 1538  $\text{cm}^{-1}$  (d), 1456  $\text{cm}^{-1}$  (e), 1385  $\text{cm}^{-1}$  (f), 1316  $\text{cm}^{-1}$  (g) and 1034  $\text{cm}^{-1}$  (h). Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. Unpaired Test t. n = 20 to control teeth e n = 20 to DH teeth.



**Figure 3.** Vibrational modes that presented statistical difference between the control group (Control) and group with DH (DH) through ATR-FTIR spectrum of GCF at: 3020 cm<sup>-1</sup> (a) and 1745 cm<sup>-1</sup> (b). Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. control. Unpaired Test t.  $n=20$  to control teeth e  $n=20$  to DH teeth.



**Figure 4.** Average Raman spectra ( $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ ) of GCF of control teeth (Control) and DH teeth (DH) and identification of known vibrational modes.



**Figure 5.** Average Raman spectrum of GCF samples collected from control group (Control) and group with DH (DH), highlighting the identified peaks with statistical difference of area (space corresponding to the start and end point of each peak). Peak position at 622 cm<sup>-1</sup> (a) and 597 cm<sup>-1</sup> (b). Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. n = 10 to control teeth e n = 10 to DH teeth.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das limitações metodológicas impostas pelo delineamento deste estudo, as seguintes considerações podem ser estabelecidas:

- O fluido crevicular gengival mostrou um grande potencial para identificar mudanças estruturais como a hipersensibilidade dentinária. Ademais, os espectros ATR-FTIR e Raman demonstraram ser uma combinação eficiente e importante na investigação da caracterização deste fluido biológico através de sua análise direta sobre papel absorvente, enfoque e modo de análise, nunca antes relatados na literatura.
- Comprovou-se a presença de modificações químicas no fluido crevicular gengival de dentes com hipersensibilidade dentinária quando comparado ao fluido de dentes controle, através da identificação de quatro modos vibratórios na composição do FCG (nos comprimentos de ondas à  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $3020\text{ cm}^{-1}$  pelo espectro ATR-FTIR e  $622\text{ cm}^{-1}$  e  $597\text{ cm}^{-1}$  usando o espectro Raman).
- Os grupos funcionais identificados (Pectina, Lipídio, Fenilalanina e Amida VI) sugerem uma relação com o mecanismo de proteção da degradação dentinária e sua sintomatologia. Colaborando, assim, para o desenvolvimento de futuros mecanismos de proteção, na manutenção do nível desses compostos no FCG e a consequente redução do dano estrutural dentinário.
- Estudos longitudinais subsequentes fazem-se necessários para o estabelecimento da relação de causa e efeito entre os mecanismos protetores relacionados aos componentes dos FCG evidenciados e a condição de HD.
- Sendo assim, esse estudo trata-se de um ponto de partida de suma importância no embasamento da identificação de componentes que possam ser usados no controle ou mesmo tratamento da hipersensibilidade dentinária.



## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraschini V, da Costa LS, Dos Santos GO. Effectiveness for dentin hypersensitivity treatment of non-carious cervical lesions: a meta- analysis. Clin Oral Investig. 2018;12. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2330-9>.
2. McGrath C, Chang B. Oral health sensations associated with illicit drug abuse. Br Dent J. 2005;198:159-162. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4812050>.
3. Douglas-de-Oliveira DW, Vitor GP, Silveira JO, Martins CC, Costa FO, Cota LOM. Effect of dentin hypersensitivity treatment on oral health related quality of life - A systematic review and meta-analysis. J Dent. 2017;(17):30302-0. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.007>.
4. Kenefck RW, Cheuvront SN. Hydration for recreational sport and physical activity. Nutr Rev. 2012;70(2):S137-S142. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00523.x>.
5. Anderson DJ, Hannam AG, Mathews B. Sensory mechanisms in mammalian teeth and their supporting structures. Physiol Rev. 1970;50:171-195. <https://doi.org/10.1152/physrev.1970.50.2.171>.
6. Brännström M. Dentin and Pulp in Restorative Dentistry. Naka, Sweden: Dental Therapeutics AB. 1981.
7. Bartold PM. Dentinal hypersensitivity: A review. Aust Dent J. 2006;51:212-218. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2006.tb00431.x>.
8. Kornfeld B. Preliminary report of clinical observations of cervical erosions: A suggested analysis of the cause and the treatment for its relief. Dent Items Interest. 1932;54:905-909.
9. Benazzi S, Grosse IR, Gruppioni G, Weber GW, Kullmer O. Comparison of occlusal loading conditions in a lower second premolar using three-dimensional finite element analysis. Clin Oral Investig. 2014; 18:369- 375. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0973-8>.

10. Soares PV, Machado AC, Zeola LF, et al. Loading and composite restoration assessment of various non-carious cervical lesions morphologies – 3D finite element analysis. *Aust Dent J.* 2015;60:309- 316. <https://doi.org/10.1111/adj.12233>.
11. Cunha-Cruz J, Wataha JC, Heaton LJ, et al. The prevalence of dentin hypersensitivity in general dental practices in the northwest United States. *J Am Dent Assoc.* 2013;144:288-296. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0116>.
12. Lussi A, Lussi J, Carvalho TS, Cvikl B. Toothbrushing after na erosive attack: Will waiting avoid tooth wear? *Eur J Oral Sci.* 2014;122:353-359. <https://doi.org/10.1111/eos.12144>.
13. Patil PA, Ankola AV, Hebhal MI, Patil AC. Comparison of effectiveness of abrasive and enzymatic action of whitening toothpastes in removal of extrinsic stains- A clinical trail. *Int J Dent Hyg.* 2015;13:25-29. <https://doi.org/10.1111/idh.12090>.
14. Herpertz-Dahlmann B. Adolescent eating disorders: Update on definitions, symptomatology, epidemiology, and comorbidity. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2015;24:177-196. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2014.08.003>.
15. Stefanski T, Postek-Stefanska L. Possible ways of reducing dental erosive potential of acidic beverages. *Aust Dent J.* 2014;59:280-288. <https://doi.org/10.1111/adj.12201>.
16. Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond).* 2007;57:169-176. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql163>.
17. Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76. <https://doi.org/10.1159/000093351>.
18. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66:623-627. <https://doi.org/10.1177/00220345870660S103>.

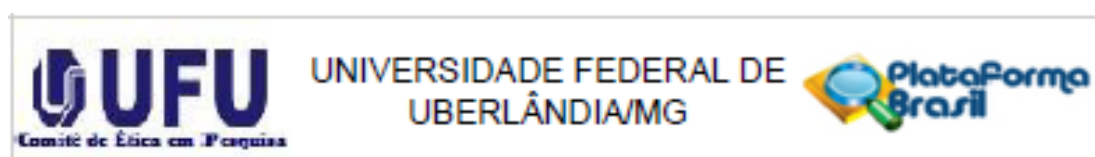
19. Chibebe PC, Terreri M, Ricardo LH, Pallos D. Na actual view of gingival crevicular fluid as a periodontal diagnosis method. *Rev. Ciênc. Méd.* 2008;17(3-6):167-173.
20. Cui Y, Fung KH, Xu J, Ma H, Jin Y, He S, et al. Ultrabroadband light absorption by a sawtooth anisotropic metamaterial slab. *Nano Lett.* 2012;12(3):1443-7. <https://doi.org/10.1021/nl204118h>.
21. Shivaprasad BM & Pradeep AR. Effect of non-surgical periodontal therapy on interleukin-29 levels in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients. *Dis Markers.* 2013;34(1):1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/620964>.
22. Perinetti G, D'Apuzzo F, Contardo L, Primožic J, Rupel K, Perillo L. Gingival crevicular fluid alkaline phosphate activity during the retention phase of maxillary expansion in prepubertal subjects: A split-mouth longitudinal study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;148(1):90-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2015.02.025>.
23. Smuthkochorn S, Palomo JM, Hans MG, Jones CS, Palomo L. Gingival crevicular fluid bone turnover biomarkers: How postmenopausal women respond to orthodontic activation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017;152(1):33-37. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.11.027>.
24. Baeza M, Garrido M, Hernández-Ríos P, Dezerega A, García-Sesnich J, Strauss F, Aitken JP, Lesaffre E, Vanbelle S, Gamonal J, Brignardello-Petersen R, Tervahartiala T, Sorsa T, Hernández M. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study. *J Clin Periodontol.* 2016;43:34-45. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12479>.
25. Wang HL, Garaicoa-Pazmino C, Collins A, Ong HS, Chudri R, Giannobile WV. Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Sep;27(9):1129-36. <https://doi.org/10.1111/clr.12708>.
26. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1767(9):1073-101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>.

27. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Vibrational Micro-Spectroscopy Of Human Tissues Analysis: Review. Crit Rev Anal Chem.2017;47(3):194-203.  
<https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1253454>.
28. Severcan F. et al. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. J Biophotonics. 2010;3(8-9):621-31.  
<https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>.
29. Al-Saeed TA & Khalil DA. Dispersion compensation in moving-optical-wedge Fourier transform spectrometer. Appl Opt. 2009;48(20):3979-87.  
<https://doi.org/10.1364/AO.48.003979>.
30. Al-Saeed TA & Khalil DA. Signal-to-noise ratio calculation in a moving-optical-wedge spectrometer. Appl Opt. 2012;51(30):7206-13.  
<https://doi.org/10.1364/AO.51.007206>.
31. Tatulian SA. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. Biochemistry, 2003;42(41):11898-907.  
<https://doi.org/10.1021/bi034235+>.
32. Sala O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho. Araraquara: Unesp; 1995.
33. Skoog DA, Holler F, Nieman TA. Princípios de Análise Instrumental. Bookman; 2002.
34. Souza FB, Pacheco MTT, Vila Verde AB, Silveira JR.L, Marcos RL, Lopes-Martins RA. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. Ver Bras Med Esporte. 2003;9(6).
35. Fenn MB. Raman spectroscopy for clinical oncology. Advances in Optical Technologies. 2011; 1-20. <https://doi.org/10.1155/2011/213783>
36. Zieba-Palus J, Kunicki M. Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. Forensic Sci Int. 2006;158(2-3):164-72. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.044>
37. Qing P, Huang S, Gao S, Qian L, Yu H. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth dentin. Clin Oral Invest. 2016;20(9):2379-86. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1731-5>.

## **ANEXOS**

---

## ANEXOS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização do fluido crevicular em dentes com hipersensibilidade dentinária associados ou não aos processos de recessão gengival e lesão cervical não cariosa.

**Pesquisador:** Paulo Vinícius Soares

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 60776916.7.0000.5152

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.001.493

#### Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: A hipersensibilidade dentária é considerada um importante problema de saúde que afeta a qualidade de vida dos pacientes e por vezes está associada ao comprometimento dos componentes periodontais e/ou as lesões cervicais não cariosas (LCNC). O grande desafio da odontologia moderna é a realização de uma forma de diagnóstico indolor e não-invasivo dessas alterações cervicais, sem promover desconforto e dor ao paciente devolvendo bem-estar social aos indivíduos portadores das mesmas. Sendo assim, este estudo objetiva caracterizar o perfil biológico e bioquímico do fluido crevicular gengival em dentes com HD ou associada isoladamente ou de forma conjunta as condições de recessão gengival (RG) e LCNC. Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, serão selecionados 60 sujeitos com dentição completa, cadastrados no programa de extensão LCNC-HD-UFU, estes serão divididos em três grupos para avaliação do fluido crevicular gengival (N=20):

Grupo 01- Dentes Hígelidos, Grupo 02- Dentes com HD, Grupo 03- Dentes com HD, RG e LCNC.

Desses grupos serão coletados o fluido crevicular gengival, com mensuração de seu volume e posterior análise por espectrômetro infravermelho de transformada de Fourier e espectroscopia por Raman, complementada pela avaliação clínica e preenchimento de questionário com fatores de variação que podem intervir na composição deste fluido.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.001.493

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Caracterizar o perfil biológico e bioquímico do fluido crevicular gengival em dentes com hipersensibilidade dentinária ou associada isoladamente ou de forma conjunta as condições de recessão gengival e lesão cervical não cariosa.

**Objetivo Secundário:**

- Avaliação da composição do fluido crevicular (grupos químicos, íons, hormônios, proteínas e enzimas);
- Analisar a alteração no volume de fluido crevicular nos diferentes níveis do fator em estudo avaliado;
- Avaliar a presença da ação de ácidos intrínsecos por meio da identificação de doenças gastro intestinais na origem e progressão das alterações cervicais não cariosas e sua consequente influência no tipo de fluido, por meio de um questionário de sintomas;
- Avaliar os níveis de correlação entre o padrão alimentar, perante um registro alimentar semanal evidenciando os alimentos de ingestão mais frequente, ao qual os elementos dentários dos grupos analisados são submetidos e possível interferência no biofluido;
- Identificar a intensidade de força proveniente da escovação a qual os elementos dentários com comprometimento cervical são submetidos e sua correlação as características do fluido crevicular;
- Analisar presença de tratamento ortodôntico prévio e histórico de cirurgia periodontal que possam alterar o padrão de fluido evidenciado;
- Diferenciar o perfil do biofluido em pacientes portadores de hipersensibilidade dentinária associada a recessão gengival provenientes de processos de reabsorção biomecânica ou processos de inflamação tecidual estagnados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores:

**Riscos:** Por se tratar de procedimentos rotineiros da prática odontológica, o único risco apresentado quanto a inclusão na pesquisa é a quebra de sigilo quanto a identificação dos participantes, que será minimizado pela codificação dos prontuários.

**Benefícios:** O benefício direto da pesquisa é o desenvolvimento de uma forma alternativa, não-invasiva e indolor de diagnóstico dessas alterações cervicais, minimizando o desconforto da forma de diagnóstico até então preconizada por estimulação da sensação dolorosa e sua mensuração.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.493

Além do benefício indireto, em que todos os pacientes que participarão das coletas receberão o posterior tratamento dessensibilizante e controle dos comprometimentos cervicais, sanando a necessidade dos pacientes envolvidos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A redação do projeto de pesquisa permite uma adequada interpretação para a elaboração do parecer ético deste comitê.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.854.895, de 05 de Dezembro de 2016, foram atendidos.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Fevereiro de 2018.

**OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Continuação do Parecer: 2.001.493

**Orientações ao pesquisador :**

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_797853.pdf	18/01/2017 00:00:07		Acelto
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	17/01/2017 23:59:43	Paulo Vinícius Soares	Acelto
Outros	Carta_Resposta_Parecer.pdf	17/01/2017 23:12:55	Paulo Vinícius Soares	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa.pdf	17/01/2017 23:11:28	Paulo Vinícius Soares	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/01/2017 23:11:07	Paulo Vinícius Soares	Acelto

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.001.493

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2017