

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Graduação em Física Médica

THAYS MARIA PEREIRA MACHADO

**PROPRIEDADES ÓPTICAS DE TECIDO ÓSSEO E MODIFICAÇÕES
ESTRUTURAIS E MECÂNICAS-PRINCIPAIS ACHADOS NA LITERATURA**

Uberlândia

2021

THAYS MARIA PEREIRA MACHADO

**PROPRIEDADES ÓPTICAS DE TECIDO ÓSSEO E MODIFICAÇÕES
ESTRUTURAIS E MECÂNICAS-PRINCIPAIS ACHADOS NA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Física da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em

Área de concentração: Física Médica

Orientadora: Prof^a Dr^a Andrea Antunes
Pereira

Uberlândia

2021

THAYS MARIA PEREIRA MACHADO

**PROPRIEDADES ÓPTICAS DE TECIDO ÓSSEO E MODIFICAÇÕES
ESTRUTURAIS E MECÂNICAS-PRINCIPAIS ACHADOS NA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Física da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em

Área de concentração: Física Médica

Uberlândia, 22 de Julho de 2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Andrea Antunes Pereira – UFU

Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Foresto Brito de Almeida – UFU

Membro

Profa. Dra. Maria de Fátima Guerreiro da Silva Campos Raposo – UNL

Membro

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida, e aos meus pais, pilares da minha formação como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desistir e por me permitir ultrapassar os obstáculos encontrados durante a graduação. Devo a Ele tudo o que sou.

Aos meus pais Aureir e Lilian por todo carinho, afeto, dedicação, renúncia, e todo investimento e dedicação que sempre concederam a mim, os dois com toda certeza foram os propulsores do meu avanço e os grandes incentivadores das realizações dos meus sonhos. Gratidão eterna. Agradeço também ao meu irmão pelo apoio e incentivo direcionados a mim.

Obrigada a todos meus amigos, aos colegas de curso e em especial a Bruna, Daniela, Danyelle e a Evelyn, minha dupla da faculdade, por compartilharem comigo momentos de companheirismo, amizade e diversão. Vocês tornaram mais leve esse intenso e difícil percurso, que possamos nos encontrar em vários futuros momentos da nossa carreira profissional, estarei torcendo pela vitória de todas mesmo seguindo caminho diferente a partir daqui.

A todos professores da Universidade que em algum momento contribuíram no meu processo de aprendizado, principalmente a minha orientadora Profa. Dra. Andrea Antunes, pelas correções, incentivo, motivação e pela disposição em compartilhar seu vasto conhecimento. Agradeço também aos professores Prof. Dr. Ádamo, Prof. Dr. Lucio Neves e à Profa. Dra. Ana Perini por todo conhecimento compartilhado que serviram para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Agradeço também a coordenação do curso de Física Médica e ao secretariado por todas informações e ajudas prestadas, e a todos que de alguma forma, contribuíram na minha formação ao longo desses anos.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos
nós ignoramos alguma coisa. Por isso
aprendemos sempre.”

(FREIRE, P)

RESUMO

A relevância da garantia da qualidade óssea é incontestável, tendo em vista que as diversas funções dos ossos como a sustentação esquelética, garantem a homeostase corporal e o bom funcionamento do corpo humano. Estudos relacionados ao diagnóstico e tratamento de doenças ósseas contribuem para melhorias no âmbito da saúde pública. As técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) atuam de forma complementar na caracterização de tecidos ósseos. Desse modo, tem se mostrado promissoras nessa aplicação. Constatou-se a partir do levantamento de artigos selecionados da literatura que o intervalo de comprimento de onda interessante é de 400-1750 cm^{-1} para espectroscopia Raman, no qual permite a visualização das principais bandas minerais e matriciais do osso e a faixa de 400-3600 cm^{-1} para espectroscopia FTIR na qual podem ser identificadas as bandas atribuídas aos grupos funcionais relativos a água e hidroxiapatita. Com base na análise dos artigos verificou-se uma progressão na obtenção de informações sobre os grupos funcionais principais indicativos de alteração nos tecidos ósseos por instauração de doenças. Notou-se também um aprimoramento tecnológico no que se refere ao aparato experimental, além da possibilidade de aplicação de imagem Raman *in vivo*.

Palavras-chave: Osso. Espectroscopia. Raman. Infravermelho.

ABSTRACT

The relevance of bone quality assurance is unquestionable, considering that the various functions of bones, such as skeletal support, ensure body homeostasis and the proper functioning of the human body. Studies related to the diagnosis and treatment of bone diseases contribute to improvements in public health. The techniques of Raman spectroscopy and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) act in a complementary way in the characterization of bone tissue. Thus, there has been some promise in this application. It was found from the survey of selected articles from the literature that the interesting wavelength range is 400-1750 cm^{-1} for Raman spectroscopy, in which allows the visualization of the main mineral and matrix bands of the bone and the range of 400-3600 cm^{-1} for FTIR spectroscopy which can be used to identify the bands assigned to the functional groups relative to water and hydroxyapatite. Based on the analysis of the articles, there was a progress in obtaining information about the main functional groups indicative of change in bone tissue due to the onset of diseases. It was also noted a technological improvement with regard to the experimental apparatus, in addition to the possibility of applying Raman imaging in vivo.

Keywords: Bone. Spectroscopy. Raman. Infrared.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 11 |
| 1.1 <i>Tecido Ósseo</i> | 14 |
| 1.1.1 Constituição, estrutura e função | 14 |
| 1.1.2 Doenças do tecido ósseo | 26 |
| 1.1.3 Modelos animais | 29 |
| 1.2 <i>Espectroscopia</i> | 29 |
| 1.2.1 Definição e importância | 29 |
| 1.2.2 Principais técnicas espectroscópicas utilizadas em osso | 31 |
| 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 2.1 <i>Raman</i> | 41 |
| 2.2 <i>Espectroscopia por FTIR</i> | 54 |
| 3 SOFTWARE <i>irAnalyze-RAMalyze</i> | 57 |
| 3.1 <i>Instalação do software</i> | 57 |
| 3.2 <i>Inicialização</i> | 62 |
| 3.3 <i>Interpretação automática do espectro</i> | 64 |
| 3.4 <i>Navegador do grupo funcional</i> | 66 |
| 3.5 <i>Pré-processamento de espectros</i> | 69 |
| 4 CONCLUSÃO E FUTURAS DIREÇÕES | 80 |
| REFERÊNCIAS | |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O progresso no diagnóstico e na prevenção de doenças do tecido ósseo depende dos avanços na compreensão das contribuições composicionais da qualidade óssea para a competência mecânica.

O tecido ósseo apresenta diversas funções imprescindíveis para a homeostase corporal ¹, por isso desperta interesse em diversos pesquisadores e, em especial, naqueles que se dedicam à estudos relacionados ao diagnóstico de doenças que ocorrem devido a distintos fatores, dentre eles podemos citar o envelhecimento da população, canceriogenese entre outras contribuindo para a instauração de doenças ósseas como osteogênese imperfeita, osteoporose, metástase óssea, raquitismo, osteomalácia, e a doença de Paget. As funções esqueléticas são inúmeras, dentre elas destaca-se sua atribuição à forma corporal dos vertebrados, que é desenvolvida pelos ossos, o que permite que cada animal se adapte ao seu habitat natural, daí então a importância do estudo dos ossos.

A importância da mineralização, de garantir o balance mineral, tem a ver com a prevenção de doenças como raquitismo e osteomalácia que são doenças ósseas surgidas por falhas no processo de mineralização do tecido ósseo, nas quais podem ocasionar carência de vitamina D. Em pessoas de até doze anos ambas doenças podem ocorrer simultaneamente, mas em idades superiores o raquitismo geralmente não ocorre, porém a idade em que o raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante (ADHR) manifesta-se difere dos outros tipos da doença, já que aparece somente na fase adolescente ou adulta.¹

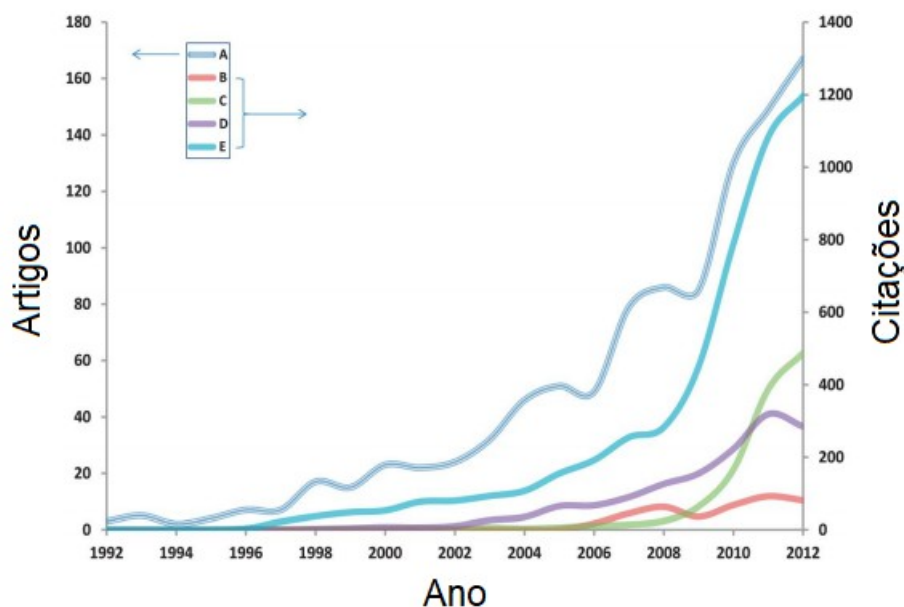
Essa pesquisa está inserida no âmbito da Física Médica devido as inquietações de caráter tecnológico inerentes às áreas de investigação que compreendem seus limites de interesse, articulando através da revisão de alguns artigos científicos o uso de técnicas de diagnósticos. Estamos inseridos numa área que se destina ao estudo, aplicação e desenvolvimento, de conceitos, modelos e princípios para compreender, aprimorar e desenvolver técnicas terapêuticas e de diagnóstico a partir de conceitos físicos como a óptica. Assim sendo, proporciona os fundamentos físicos e base científica para emprego na Medicina, proporcionando melhorias no âmbito da saúde pública. Engloba diversos modos de diagnóstico e terapia, por exemplo, radioterapia, ultrassom para diagnóstico, imagens por ressonância

magnética, a radiologia diagnóstica, medicina nuclear, e um dos mais recentes que é a aplicação de luz visível, os quais são importantes para os avanços das áreas da medicina voltada ao tratamento e técnicas espectroscópicas diversas. ²

Nesse contexto, este trabalho pretende explorar a literatura neste campo de investigação a fim de estudar a composição do tecido ósseo, dimensões e características, além do levantamento bibliográfico sobre o uso da espectroscopia e sua aplicação no tecido ósseo. A finalidade é analisar as técnicas mais empregadas para diagnóstico de doenças ósseas e as metodologias empregadas fazer uma analogia entre esses métodos com a finalidade de particularizar cada um deles.

Para isso, a pesquisa foi baseada em estudos já realizados por diferentes autores. Com os conceitos expressos pelos pesquisadores e/ou especialistas da área, compreenderemos a importância que esses trabalhos possuem para a evolução de métodos de diagnóstico e até mesmo na prevenção de doenças que se não tratadas, poderiam causar danos irreparáveis aos pacientes. Na Figura 1 apresenta-se o número de publicações e citações por ano de artigos relacionados a espectroscopia Raman, em um jornal científico entre os anos de 1992 e 2012.

Figura 1 - Publicações e citações no ISI Thomson Web of Science por ano, de A) Raman e doença, B) Raman espacialmente deslocado e doença, C) SERS e doença, D) Espectroscopia Raman, E) Imagem Raman e doença, durante os anos de 1992-2012.



Fonte: Adaptada de ³⁵.

A principal motivação para a realização desse trabalho está em compreender a forma com que técnicas ópticas são empregadas para caracterizar o tecido ósseo e para aperfeiçoar ferramentas de prevenção de doenças que acometem os ossos. Com a finalidade de expor este trabalho de forma mais coerente e oportunizando uma melhor leitura, escolheu-se dividir esta pesquisa na seguinte ordem que se apresenta.

No primeiro capítulo será apresentada uma descrição do tecido ósseo dando foco na sua constituição, estrutura, funcionalidade, propriedades físicas, químicas e biológicas, de acordo com os artigos analisados e a relação de similaridade entre os ossos e dentes. Além disso, serão abordadas as doenças mais comuns do tecido ósseo, pretendendo entender a evolução dessas patologias, para que futuramente estudos relacionados a esse assunto possam contribuir para o avanço da tecnologia direcionada ao diagnóstico e/ou tratamento precoce, além do destaque de alguns modelos animais mais utilizados em pesquisas já realizadas, e as diferenças observadas entre os humanos e esses animais. Por fim, também será exibida nesse capítulo a definição de espectroscopia e sua importância, a fim de proporcionar maior compreensão do mecanismo de atuação, as técnicas espectroscópicas empregadas para a investigação óssea associada aos princípios físicos envolvidos.

No segundo capítulo serão exibidos os principais achados na literatura, destacando algumas formas de preparação de amostras ósseas executadas por pesquisadores, além dos resultados dos trabalhos selecionados no levantamento bibliográfico e uma breve discussão desses achados relevantes relacionados a espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier.

O terceiro capítulo será destinado a um programa de interpretação de dados espectrais, e ao mini roteiro que será elaborado com o intuito de exibir o passo a passo de como executar algumas técnicas de pré-processamento neste programa. As conclusões serão expressas no quarto capítulo, subsequentemente as referências bibliográficas utilizadas serão apresentadas.

1.1 Tecido Ósseo

1.1.1 Constituição, estrutura e função

O osso é um tecido conectivo, cuja funções reservam-se à nutrir e preencher espaços interteciduais além de oferecer sustentabilidade ao corpo. Quanto a constituição deste tecido trata-se de duas fases, orgânica e inorgânica, encontradas em proporções distintas, 30 % e 70 % respectivamente, enquanto na fase orgânica a composição é basicamente por colágenos tipo I, com função na mineralização óssea, e por outras proteínas não colágenas já na fase inorgânica a constituição é a partir do mineral hidroxiapatita.³

Os ossos e dentes possuem características compositional semelhantes já que ambos são constituídos por minerais inorgânicos de fosfato de cálcio, a dentina, que é a parte que dá forma ao dente, assim como o osso também é um material formado por cristais de apatita. O colágeno é uma das proteínas mais abundantes no corpo humano e são eles os principais responsáveis pela deposição dos cristais de apatita, o tipo I além de ser o mais comum, está relacionado aos ossos, dentina, pele, tendões e outras estruturas.⁴

Os ossos apresentam diversas funções como a sustentação de tecidos moles como os músculos, armazenamento e liberação de componentes importantes na corrente sanguínea, são responsáveis também pela proteção dos órgãos contra traumatismos, além de atuar junto com as cartilagens para a formação do sistema de alavanca corporal, promovendo assim mobilidade ao corpo. As articulações que possuem maior mobilidade geralmente são aquelas que unem ossos longos, as diartroses.⁵

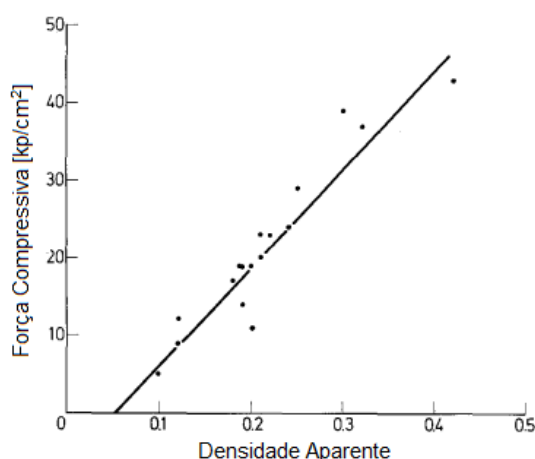
A organização da matriz extra celular (MEC) esquelética 3D permite a transmissão do estresse mecânico, que tem se mostrado a base do desenvolvimento ósseo. A homeostase óssea, é geralmente garantida pela sinergia de osteoblastos e osteoclastos, que secretam e reabsorvem respectivamente a MEC durante a remodelação óssea, o osso lamelar maduro é substituído⁶ por um novo tecido no qual é formado livre de micro-lesões causadas por alguma das atividades cotidianas, ou até mesmo um dano maior como uma fratura. Mais de 90 % do número total de células ósseas são compostas por células que são

responsáveis por sentir e conduzir a força mecânica transmitida pelo osso, coordenando assim os sinais de absorção e deposição óssea.³

Há peculiaridades sobre os ossos que são importantes, e visíveis a olho nú ao realizar uma análise cuidadosa quanto à composição esquelética, como o fato de apresentar osso cortical (compacto) que possui como uma de suas funções a proteção e o osso trabecular (esponjoso). O primeiro tipo, cortical, forma uma “concha sólida ao redor do osso” que compreende-se em unidades chamadas osteons, revestido pelo periosteio e que apresenta densidade igual a 1.92 g/cm^3 ⁷, já o osso trabecular é formado por osso lamelar menos denso, e é cercado pelo osso cortical sempre sendo a espessura e a resistência da parte cortical dependentes do ponto em que são localizados.⁸ A qualidade óssea é considerada a partir de uma avaliação da espessura cortical e da distribuição trabecular tecidual.

O comportamento biomecânico do osso cortical tende a ser estável enquanto o osso trabecular apresenta oscilação quanto a resistência e rigidez que geralmente, dependem da densidade aparente⁸ com a qual variam diretamente como é mostrado na Figura 2.




Figura 2 - Força compressiva de amostras de osso vertebral em função da densidade aparente.



Fonte: Adaptada de ⁹.

A densidade óssea trabecular é distinta para cada tipo de osso, assim como é mostrado na Tabela 1.


Tabela 1 - Valores de referência de densidade óssea trabecular para diferentes tipos de osso, de acordo com a classificação de Lekholm e Zarb.

| Qualidade óssea (de acordo com Lekholm & Zarb) | | Escala de densidade (segundo Norton & Gamble) [HU] | Escala de densidade (segundo ¹⁰) [HU] |
|--|---|---|---|
| Osso tipo 1 | | | |
| Quase toda a mandíbula composta por osso compacto homogêneo |  | > 850 | > 400 |
| Osso tipo 2 | | | |
| Núcleo de osso trabecular denso envolto por espessa camada de osso compacto |  | 500 a 850 | 200 a 400 |
| Osso tipo 3 | | | |
| Núcleo de osso trabecular denso envolto por fina camada de osso compacto, força favorável |  | 500 a 850 | 200 a 400 |

[HU] = Unidades de Hounsfield.

Fonte: Adaptada de ¹⁰.

Tabela 1 - Valores de referência de densidade óssea trabecular para diferentes tipos de osso, de acordo com a classificação de Lekholm e Zarb. (continuação).

| Qualidade óssea (de acordo com Lekholm & Zarb) | | Escala de densidade (segundo Norton & Gamble) | Escala de densidade (segundo ¹⁰) |
|---|---|--|--|
| Osso tipo 4 | | | |
| Osso trabecular de baixa densidade envolto por fina camada de osso cortical |  | 0 a 500 | < 200 |
| Osso tipo 4* | | < 0 | — |

*Categoria de qualidade adicional descrita como zona falha por Norton & Gamble.

[HU] = Unidades de Hounsfield.

Fonte: Adaptada de ¹⁰.

Forças externas geralmente expressas em unidades de Pascal (Pa), podem atuar no osso sujeitando-o à deformações estruturais de diferentes intensidades e padrões, que podem ser expressas em porcentagem %, e essa relação tensão-deformação viabiliza o aspecto do osso em relação ao seu comportamento mecânico quando submetido a deformações provocadas por cargas físicas. Outra característica importante é que o osso é considerado anisotrópico, ou seja, sua propriedade elástica assume valores diferentes a depender da direção que se refere, na Tabela 2 constam os valores médios de resistência máxima, módulo da elasticidade e coeficiente de Poisson do osso cortical.¹¹

Tabela 2 - Valores anisotrópicos médios de resistência máxima (compressão, tensão, cisalhamento), módulo de elasticidade e coeficiente de Poisson no osso cortical.

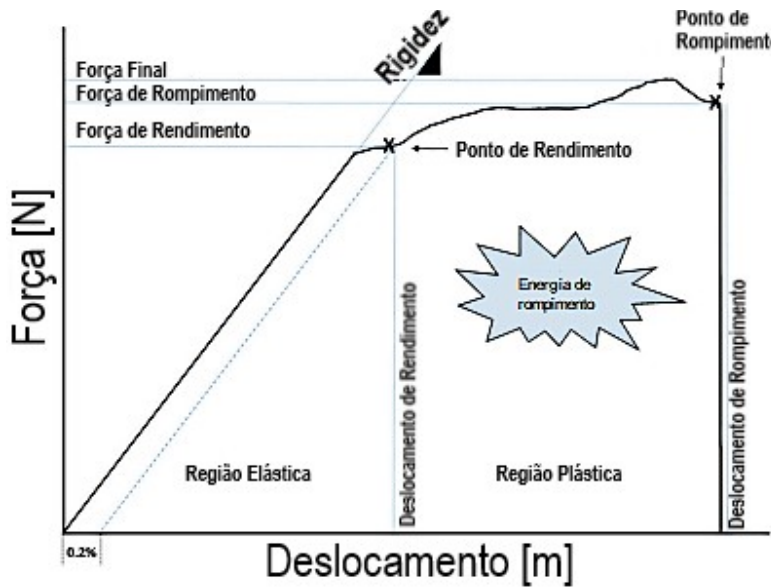
| | | |
|---------------------------|------------------------|--------|
| Longitudinal [MPa] | Compressão | 193 |
| | Tensão | 133 |
| | Módulo | 17,000 |
| | Coeficiente de Poisson | 0,40 |
| Transversal [MPa] | Compressão | 133 |
| | Tensão | 51 |
| | Módulo | 11,500 |
| | Coeficiente de Poisson | 0,62 |
| Cisalhamento [MPa] | Cisalhamento | 68 |
| | Módulo | 3,300 |

* Osso trabecular: ≈ 50 MPa (compressão), ≈ 8 MPa (tensão), ≈ 400 MPa (módulo) longitudinalmente.

Fonte: Adaptada de ¹¹.

Devido as particularidades de cada modo comportamental possível do osso, há duas regiões na curva tensão-deformação que são importantes: região elástica e região plástica, na primeira área trata-se de valores de força abaixo do “yield point” ou ponto de rendimento. Permite com que o material ósseo se armazene elasticamente e retorne à tensão aplicada, evitando micro-danos no processo. Já a parte plástica, os níveis de deformação são acima do ponto de rendimento fazendo com as deformações acarretem danos na forma de micro-fissuras, geralmente. Ambas as regiões são mostradas na Figura 3 abaixo.

Figura 3 - Curva de tensão-deformação e regiões elástica e plástica.

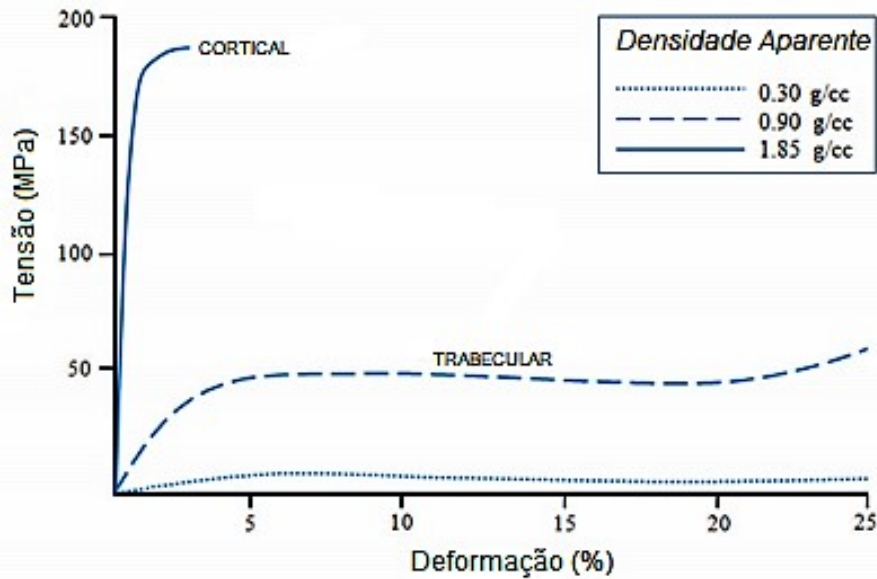


Fonte: Adaptada de ¹¹.

A área sob a parte elástica da curva de tensão-deformação refere-se à capacidade dos ossos de armazenar energia elasticamente e, portanto, resistir a micro-danos, característica nomeada como resiliência. A elasticidade/rigidez do material biológico têm alta influência no gradiente da curva tensão-deformação. A área total sob as regiões elástica e plástica sob a curva tensão-deformação é caracterizada por tenacidade do esqueleto, a qual pode ser alterada por mudanças na resiliência, modificando assim a quantidade total de energia absorvida pelo osso antes da falha.

A densidade aparente é a especificação do osso quanto ao grau de porosidade e mineralização capaz de determinar a qualidade desse material bifásico. Essa propriedade influencia na capacidade de resistência à deformação - rigidez; na absorção de tensões - elasticidade e na absorção de energia - tenacidade antes de ocorrer a falha, que é a resistência máxima que ele admite.¹¹ Na Figura 4 é apresentado as curvas em relação a tensão em função da porcentagem de deformação do osso cortical e trabecular.

Figura 4 - Características de tensão-deformação do tecido macroscópico.

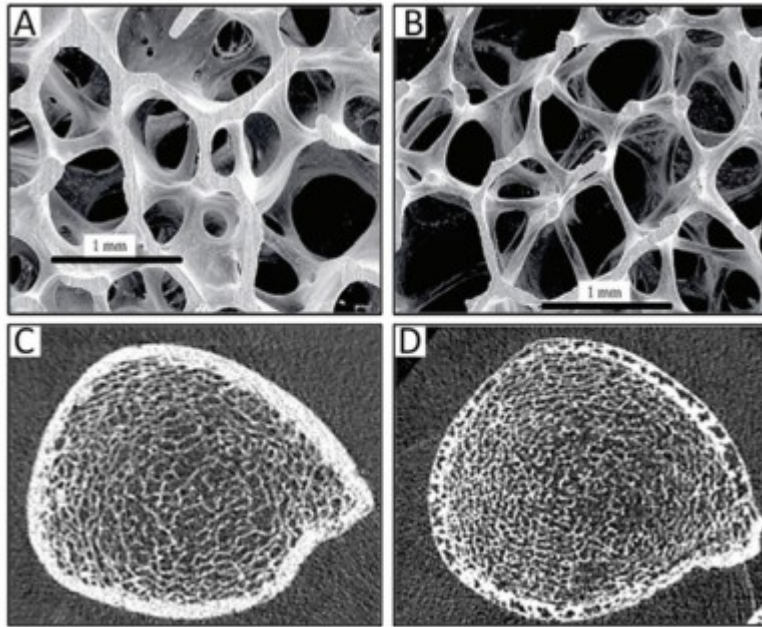


Fonte: Adaptada de ¹¹.

Segundo Hart et al.¹¹, a interação do tecido macroscópico (cortical e trabecular), propriedades materiais (orgânico e inorgânico) e as propriedades estruturais (geometria de e distribuição) estabelece juntos modificações do comportamento mecânico do osso com o intuito de se adaptar a diferentes cargas mecânicas as quais são submetidos. O osso cortical é mais rígido em relação ao osso trabecular. Este apresenta alta resistência (≈ 150 MPa) ao estresse e baixa resistência à deformação (2 % de rendimento) enquanto o segundo é de natureza porosa, possui baixa resistência (≈ 50 MPa) ao estresse e alta resistência à deformação (rendimento de 50 %) portanto apresenta maior elasticidade.¹¹ Na Figura 5 pode ser observado os aspectos tanto da deterioração da espessura como a porosidade dos dois tipos de tecidos macroscópicos dos ossos, além da região de conectividade.

Figura 5 - Danificação da arquitetura óssea. A) Osso trabecular normal apresentando maior número de trabéculas (filamentos esponjosos cruzados) e

consequentemente maior conectividade. B) Osso trabecular osteoporótico com separação trabecular, evidenciando menor conectividade e maior risco a fragilidade. C) Osso cortical de paciente normal sem fraturas e D) Osso cortical com fraturas por fragilidade osteoporótica, com aumento de porosidade caracterizando degradação do osso. A arquitetura trabecular em C e D foram mantidas.

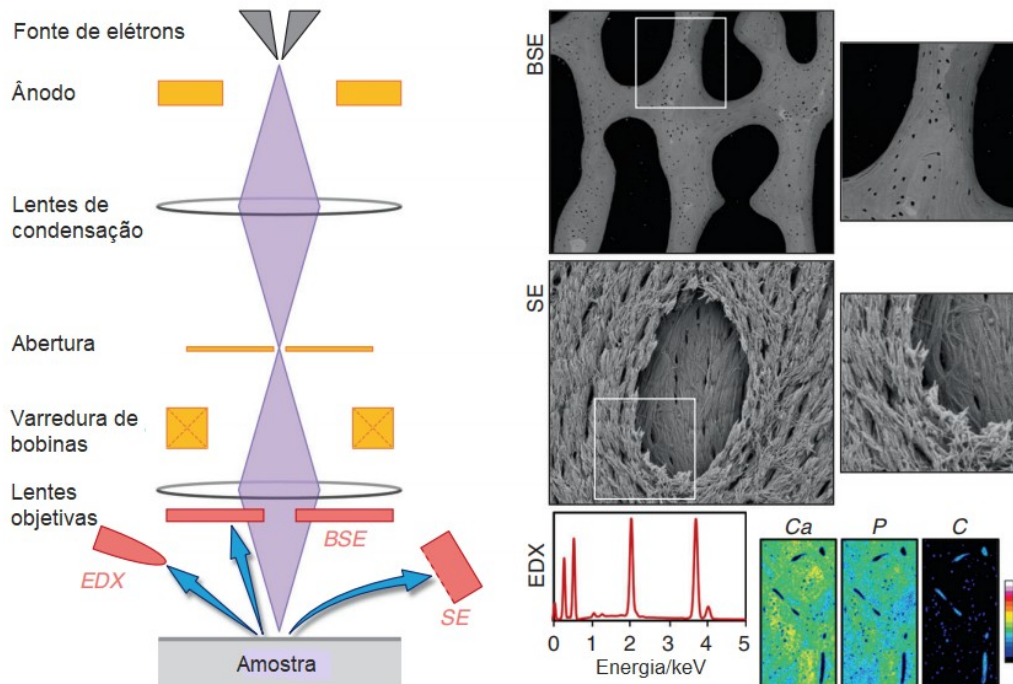


Fonte: Adaptada de ¹¹.

Sabendo da complexidade composicional e da dificuldade nos estudos ósseos, a utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) oferece um ótimo aporte, tendo em conta que através dos sinais gerados a partir da interação entre os elétrons incidentes e os átomos da amostra, consegue-se obter uma examinação de qualidade quanto a estrutura e função do osso devido sua alta resolução espacial a alta profundidade de campo e um amplo campo de visão, e inclusive do desenvolvimento da arquitetura óssea em função da idade.¹² Na Figura 6 são apresentadas imagens do esquema instrumental da SEM e os sinais gerados em osso.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura (SEM) e os sinais típicos que são registrados do osso. BSE - Elétrons retroespalhados (elétrons do feixe

incidente de alta energia, desviados devido a interação do espalhamento elástico com os núcleos dos átomos), SE - Elétrons secundários (elétrons de baixa energia ejetados de camadas mais internas dos átomos da amostra, resultantes da interação de espalhamento inelástico com os elétrons incidentes do feixe) e EDX - Espectroscopia de raios X de energia dispersiva.

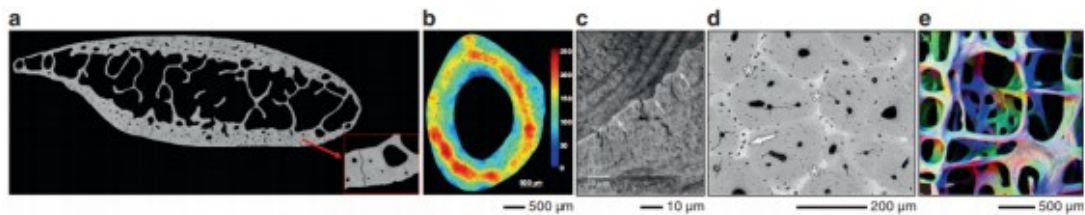


Fonte: Adaptada de ¹².

A microscopia eletrônica de varredura permite discriminar as partes mineralizadas e não mineralizadas do osso, determinação da idade média do tecido e a cinética de mineralização já que a intensidade do sinal BSE é proporcional a concentração de mineral ósseo¹², nas Figuras 7-7.2 são apresentadas imagens ósseas obtidas no SEM de diferentes tipos de osso, algumas delas incluindo os sinais detectados na interação entre os elétrons retroespalhados (BSE) e os átomos incidentes na amostra.

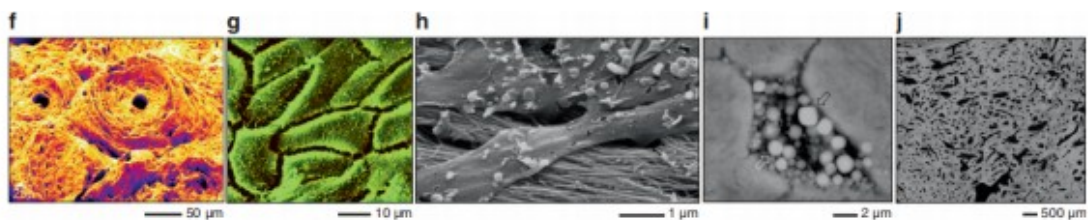
Figura 7 - Imagem óssea no microscópio eletrônico de varredura (SEM). a) Fotomontagem BSE-SEM de uma costela humana vista em corte transversal. Podem ser destacadas variações locais na densidade de mineralização, canais

Haversianos, espaços de reabsorção e lacunas de osteócitos. b) Densidade lacunar de osteócitos determinada a partir de imagens BSE. c) Linha de cimento (hipermineralizada, imagem mais brilhante) entre os ósteons e o osso intersticial. d) Os espaços intertrabeculares no osso do chifre (rede de osso trabecular, com alta resistência) de veado (*Capreolus capreolus*) são ocupados por ósteons primários ocupados antes da reabsorção óssea na superfície trabecular. Podem ser identificadas trabéculas (asteriscos) e ilhas não remodeladas de cartilagem calcificada (seta). e) BSE-SEM topográfico que fornece informações direcionais de formas 3D complexas como o osso trabecular. Uma imagem separada é gravada para cada setor de 90° de um detector BSE anular, contendo informações sensíveis à direção da iluminação aparente (setas).



Fonte: ¹².

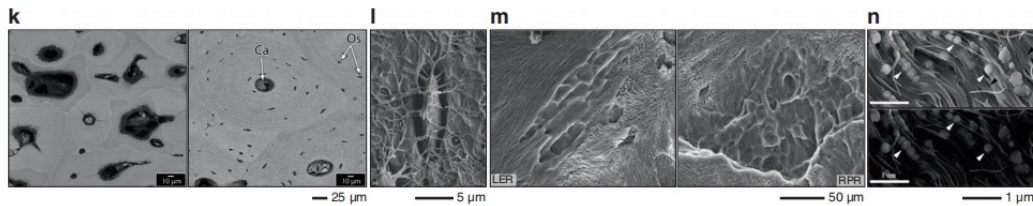
Figura 7.1 - f) Extensão do ósteon pull-out (mecanismo de endurecimento do osso cortical) sob carga mecânica cíclica observada usando imagens SE. g) Detalhe da superfície celular dos osteoblastos na superfície do osso parietal. h) Osteoblastos parecem organizar fibrilas de colágeno por meio de processos basais planos. i) Lacuna de osteócitos hipermineralizada contendo detritos apoptóticos mineralizados. j) Microestrutura óssea severamente desorganizada na melorreostose (espessamento cortical com intensa atividade de formação óssea relacionada com o aprisionamento de osteócitos).



Fonte: ¹².

Figura 7.2 - k) Osso com (direito) e sem (esquerdo) osteócitos. l) Visualização dos osteócitos e a rede lacuno-canalicular (promove comunicação entre osteócitos, osteoblastos e células de revestimento ósseo)¹³ condicionada a moldes de resina. m) Lacunas de Howship: lacunas de reabsorção estendidas longitudinalmente (LER;

esquerda) e lacunas de reabsorção de remendo reticulado (RDP; direita). n) Cyro-SEM. A combinação de imagens SE (acima) e BSE (abaixo) fornece informações morfológicas e composicionais.



Fonte: ¹².

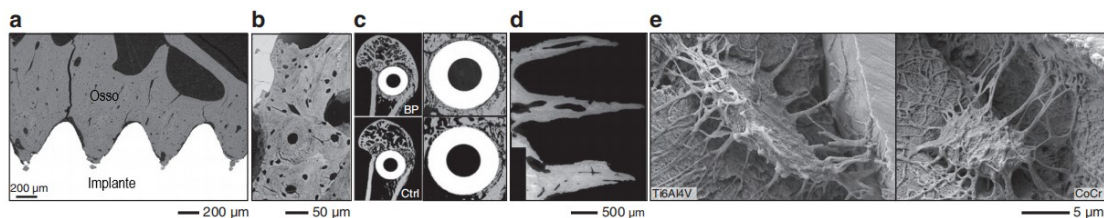
O osso é um tecido metabolicamente ativo que é constantemente remodelado no decurso da vida de uma pessoa, primeiramente ele é destruído: absorção óssea, para posteriormente ser reconstruído: formação óssea, nas fases iniciais da vida humana o processo de formação óssea é mais rápido do que o de absorção o que provoca o fortalecimento dos ossos já que se tornam maiores, mais pesados, e mais densos. Essa condição continuará até que a densidade e força óssea atinjam o seu nível máximo, que geralmente ocorre quando o indivíduo apresenta uma idade por volta dos 30 anos, a fase de estabilidade óssea relativa se iniciará então a partir daí e perdurará por mais ou menos cerca de 15 anos, após esse estágio os problemas relacionados a redução da qualidade e quantidade dos ossos geralmente começam surgir.¹⁴

Os tipos de ossos são distinguidos sobretudo, por características na escala do órgão (cm), ossos longos consistem em um cilindro externo de osso cortical em torno de uma cavidade medular que inclui hastes de osso trabecular, enquanto ossos planos possuem disposições variáveis como a quantidade de tecido esponjoso. Os componentes dos dentes também são diferenciados desta forma. O ligamento periodontal é a conexão entre os dentes e a mandíbula através do cimento, enquanto o envoltório externo do dente até a linha da gengiva é o esmalte, e abaixo do esmalte está a dentina, o principal componente dos dentes. A dentina envolve a cavidade pulpar, que contém nervos e vasos sanguíneos necessários para o cumprimento da função dos dentes.¹⁵

Em casos de falha na função tecidual óssea ou mesmo a falta desse tecido, uma alternativa para suprir essa deficiência são os implantes de biomateriais cuja função é a osseointegração.¹² É importante a examinação pós implante da área a que foi

submetida o procedimento, e para isso, utiliza-se imagens BSE como é mostrado na Figura 8.

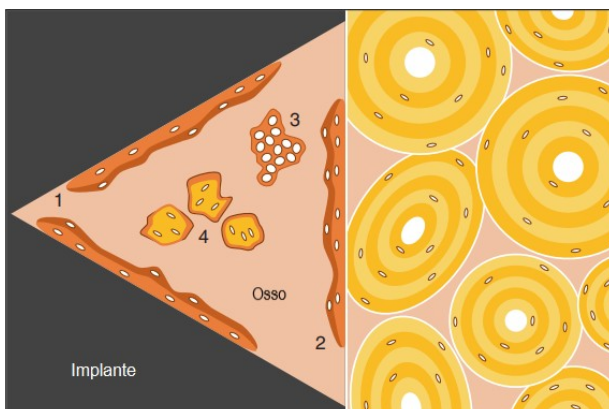
Figura 8 - Imagem do osso ao redor de implantes de biomateriais. a) Imagem BSE de osso formado em torno de implante de titânio ablacionado (remoção cirúrgica) a laser. b) Imagem BSE de implantes de titânio revestidos com hidroxiapatita (HAp). c) Promoção de formação óssea a partir de distribuição local de bifosfonato (BF) de implantes de titânio comercialmente puro (cp-Ti) revestidos com HAp (3mm de diâmetro). d) Crescimento interno de tecido mineralizado em suportes de policaprolactona + β -tricálcico (80:20) impressos em 3D repetindo o padrão das escoras de 0°/90°. e) Condicionamento com molde resina para visualização direta da fixação de osteócitos em várias superfícies de implante (exemplo 1: ligas de titânio Ti6Al4V e exemplo 2: liga de cromo-cobalto CoCr).



Fonte: Adaptada de ¹².

O implante cicatriza o defeito antes existente a partir da formação óssea, na Figura 9 são apresentadas as regiões remodeladas desde a superfície do implante até a formação do novo tecido.

Figura 9 - Osteogênese em torno de implantes de biomateriais. 1 - Osteogênese de contato (superfície do implante, início do processo de formação óssea), 2 - Osteogênese à distância (margem óssea do defeito cirúrgico), 3 - Tecido ósseo formado, 4 - Fragmentos de osso autógeno (promove reconstrução óssea).



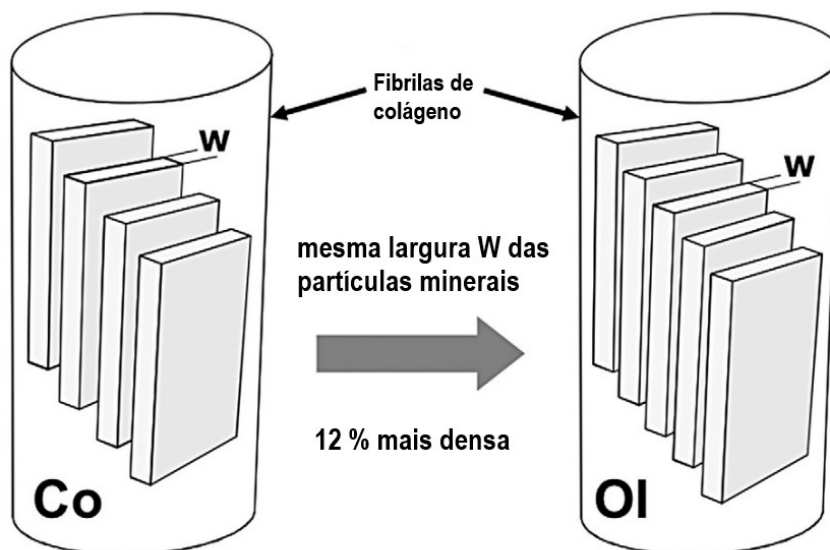
Fonte: Adaptada de ¹².

1.1.2 Doenças do tecido ósseo

Osteogênese Imperfeita-OI

Essa disfunção óssea geralmente é hereditária, precede a osteoporose, e está relacionada com o defeito na densidade (quantidade) colágena, acarretando fragilidade ao osso, inclusive nos dentes que podem ser acinzentados, baixa estatura e maior suscetibilidade a fraturas.¹⁶ No Brasil foi fundada pelo Ministério da Saúde, em 1999, a Associação Brasileira de Osteogenesis Imperfecta - ABOI que além do seu objetivo de incentivar pesquisas relacionadas a doença, estabeleceu um Protocolo de Tratamento Clínico específico¹⁷. Apesar das partículas minerais serem semelhantes, em relação ao tamanho, nos casos de pessoas normais e pacientes OI ou os chamados “ossos de vidro”, a principal diferença se dá na densidade das mesmas¹⁸ como é ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática, ilustrando a diferença nanoestrutural óssea entre osso normal (controle-Co) e osso com osteogênese imperfeita (OI).



Fonte: Adaptada de ¹⁸.

Osteoporose

Em virtude da constante renovação óssea, a idade do animal seja humano, ou não, e do tecido ósseo influencia na característica composicional do mesmo,⁴ com o envelhecimento e algumas outras condições como deficiência hormonal estrogênica, as propriedades mecânicas e as características constitucionais dos ossos podem ser prejudicadas e possivelmente ocasionar fraturas com maior facilidade devido a perda de tenacidade e resistência óssea.⁸ Além de fatores naturais, a redução progressiva da massa óssea pode ser uma decorrência de um dos distúrbios

humanos mais comuns. Esta acarreta o enfraquecimento dos ossos tornando-os propensos a quaisquer fraturas, denominado osteoporose.

Essa doença óssea provém de uma desarmonia durante o processo de remodelação óssea ³, já que a reabsorção óssea (quebra do tecido ósseo) ¹⁴ domina este processo metabólico. A osteoporose pode acometer a homens e mulheres, porém pessoas do sexo feminino apresentam maior tendência ao desenvolvimento dessa patologia.¹⁴ Estima-se que uma a cada três mulheres com idade superior a 50 anos apresentarão alguma fragmentação osteoporótica em algum momento de suas vidas enquanto apenas um a cada cinco homens dessa mesma faixa etária possivelmente manifestarão esse problema.³

Essa fragilidade esquelética é considerada um problema da saúde pública, no Brasil sabe-se que o acesso a exames que constatarem esse tipo de doença como a densitometria óssea, em que se consegue prever o risco de fratura utilizando um aparelho de dupla emissão de raio X (DXA)¹⁹, ainda é limitado fazendo com que se tenha dificuldades na estimativa do número de brasileiros com osteoporose.²⁰ Na Tabela 3 é apontada uma classificação quanto a densidade mineral óssea de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Tabela 3 - Classificação da densidade mineral óssea segundo a Organização Mundial de Saúde, com base no *T-score* que é o valor da densidade óssea comparada com pacientes do mesmo sexo e idade compatível.

| Classificação | <i>T-score</i> [DP] |
|-------------------|---|
| Normal | Maior ou igual a 1.0 |
| Osteopenia | Entre 1.0 e 2.5 |
| Osteoporose | Menor ou igual a 2.5 |
| Osteoporose grave | Menor que 2.5 com pelo menos uma fratura, causada por fragilidade |

Obs.: DP é a unidade de medida chamada de desvio padrão.

Fonte: ¹⁹.

Metástase Óssea

Cada vez mais agentes e tecnologias de contraste óptico de imagem têm sido desenvolvidos, especialmente para pesquisa da estrutura óssea e metástases esqueléticas. O aumento do interesse no estudo relacionado a esses problemas relaciona-se com o número de casos de doenças metastáticas, segundo Nicholas Cho e Monica Shokeen mais de 600.000 adultos com mais de 40 anos são diagnosticados com metástase óssea todos os anos nos EUA.²¹

É caracterizada por metástase a interação de células cancerígenas e células normais²² o que provoca proliferação tumoral à diferentes partes do corpo, que no início não apresentavam nenhum indício de neoplasias malignas. Metástases esqueléticas geralmente não são silenciosas já que é comum os pacientes apresentarem dores fortes, compressão da coluna, excesso de cálcio no sangue, fraturas espontâneas²¹ e em alguns casos ocorre o óbito do paciente associado ao estágio final de câncer de mama ou próstata.²³ É importante destacar também que depois das células se asilarem no esqueleto, a hipótese de cura tumoral é descartada e o único objetivo daí em diante passa a ser o tratamento paliativo.²²

Em casos de carcinomas mamários a etapa final da destruição óssea é mediada pelos osteoclastos, que são estimulados pelos peptídeos tumorais relacionados ao hormônio peptídeo da paratireóide (PTH-rP), já os casos de câncer de próstata são controlados pelos osteoblastos que são impulsionados a produzir mais ossos.²² Estudos mais minuciosos sobre metástases ósseas serão de grande relevância para o futuro.

Raquitismo

O exame radiológico de uma pessoa pode sugerir que ela apresente raquitismo, mas a diferença no diagnóstico se dá a partir da história médica, dados clínicos e estudos laboratoriais, especialmente do cálcio no sangue, fosfatoemia e atividade da fosfatase plasmática alcalina. Ao mesmo tempo, frequentemente há sinais de que o metabolismo anormal do fosfato de cálcio têm impacto na função muscular e no desenvolvimento dentário.²⁴

Doença de Paget

Afeta geralmente os ossos da pelve, o fêmur e ossos do crânio. Os homens apresentam maior probabilidade em relação às mulheres a desenvolver a doença.

Pesquisas dizem que aproximadamente 1 % da população dos Estados Unidos com idade superior a 40 anos sofrem dessa doença.²⁵

1.1.3 Modelos animais

Todos os animais vertebrados apresentam o sistema esquelético, formado pelos ossos, que são estruturas constituídas por tecido ósseo, considerados materiais biológicos com propriedades físicas especiais e dureza elevada, devido principalmente a estrutura tubular oca, laminação, matriz internamente reforçada e também a presença de cálcio e fibras de colágeno em sua constituição.²⁶

O rato é o modelo animal mais utilizado nos estudos, mas conseguiram demonstrar que o roedor apresenta as mais significativas diferenças em relação à densidade, composição e propriedades mecânicas do osso humano e também em relação aos outros modelos animais que geralmente são usados como bovinos, suínos, ovinos, caninos, entre outros.³ Além do que, devido às dissemelhanças nos modos de consolidação e remodelação óssea, os modelos animais geralmente empregados para pesquisar a fisiopatologia óssea também apresentam imperfeições.

1.2 Espectroscopia

1.2.1 Definição e importância

Há pesquisadores que se dedicam a buscar métodos cada vez mais precisos e melhores para a determinação do quanto de energia e qual é essa energia que uma substância ou material singular absorve devido a incidência de uma luz, além de explorarem também a parte dessa luz que é refletida em um comprimento de onda diferente da luz incidente. Esse campo da ciência é intitulado por espectroscopia, a qual advém dos estudos da interação da luz (energia eletromagnética) com a matéria.²⁷ A energia cedida pela radiação eletromagnética só será absorvida no comprimento de onda, λ , pela molécula se for no mínimo igual ao chamado *gap* de energia (energia suficiente para a passagem da banda de valência para a banda de condução, ou vice versa), que é definida pela quantidade: ²⁸

$$\Delta E = h\nu = \frac{h c}{\lambda} \quad (1)$$

Perante análise das diferentes partes do espectro eletromagnético obtido, é possível realizar a sondagem do interior de estruturas compostas por substâncias atômicas e moleculares e então obter "impressões digitais" que podem ser usadas para identificá-las e avaliar suas concentrações relativas a partir dos diferentes picos.²¹ O espectro abrange todos os possíveis comprimentos de onda de radiação eletromagnética devido aos sete tipos de ondas: as ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, luz visível, raios ultravioleta, raios x e raios gama, as quais são classificadas conforme suas origens e também aos seus valores de comprimento de onda/frequência,⁴ mas em espectroscopia a faixa espectral de interesse é apresentada na Tabela 4 em termos de seu respectivo comprimento de onda associado.

Tabela 4 - Regiões de interesse na espectroscopia do espectro eletromagnético.

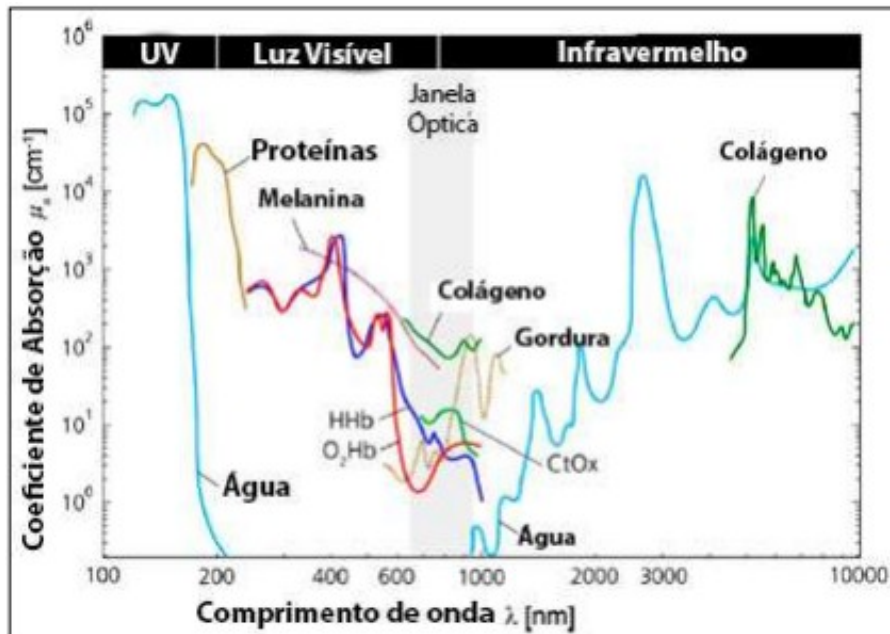
| Região | Comprimento de onda (λ) |
|------------------------|-----------------------------------|
| Ultravioleta distante | 0,5 nm - 200 nm |
| Ultravioleta | 200 nm - 400 nm |
| Visível | 400 nm - 700 nm |
| Infravermelho próximo | 700 nm - 1.200 nm |
| Infravermelho médio | 1.200 nm - 40.000 nm |
| Infravermelho distante | 40.000 nm - 1.000.000 nm |

Fonte: Elaborada com base em ⁴.

A fim de observar as bandas espectrais, a luz primeiro atravessa uma fenda, em seguida a imagem da lacuna é refratada por um prisma ou difratada por uma grade e gravada em um espectrômetro. Para cada comprimento de onda de luz diferente, a fenda é fotografada no filme com posições e intensidades diferentes, formando assim uma "impressão digital" da luz específica. O espectrômetro imprime um gráfico para cada uma das amostras em análise para que posteriormente, esses gráficos possam ser comparados entre si, bem como gráficos de substâncias conhecidas em materiais de referência.⁴ Composições diferentes, apresentam

diferentes cromóforos (grupos funcionais), os quais absorvem comprimentos de onda distintos, ou seja, em regiões espectrais diferentes assim como é exibido na Figura 11.

Figura 11 - Espectro de absorção de alguns constituintes de tecido biológico humano, com janela óptica (locais onde a absorção de água e moléculas orgânicas, é menor) na região do infravermelho próximo.²⁹



Fonte: ³⁰.

Há duas principais ferramentas de aquisição de dados espectrais: o mapeamento e a imagem e tais estratégias se diferenciam no modo de obtenção dos espectros, enquanto o primeiro método realiza a aquisição dos espectros do movimento da amostra em relação ao laser, o segundo atinge as informações sem este movimento. O mapeamento pode ser ponto a ponto o qual o espectro é adquirido no ponto/pixel da amostra em que o laser é focado, ou de varredura linear em que a aquisição sucede em uma linha de pixels em uma certa direção enquanto técnicas de imagem permitem a aquisição de espectros de toda a amostra simultaneamente.³¹

1.2.2 Principais técnicas espectroscópicas utilizadas em osso

O estudo das características e das funções estruturais de amostras biológicas ainda é considerado um desafio para os pesquisadores de diversas áreas científicas devido a alta complexidade desses átomos e a quantidade de frequências

vibracionais a serem resolvidas, entre diversas ferramentas espectroscópicas as espectroscopias vibracionais por Raman e de infravermelho por Transformada de Fourier, destacam-se por serem sensíveis, reproduzíveis e fornecerem informações sobre a estrutura molecular dos ossos.

Raman

A espectroscopia Raman é uma espectroscopia vibracional que detecta ligações químicas e luz espalhada de biomoléculas a partir da excitação do laser na região do infravermelho próximo (NIR). Essa luz interage com fônons de baixa frequência, fazendo com que os fótons dispersos inelasticamente sejam alterados para um valor de energia diferente da excitação. Este deslocamento é medido com base na diferença entre o comprimento de onda de excitação e o recíproco do comprimento de onda de detecção e fornece informações específicas para a ligação química. Essa técnica espectroscópica depende da polarizabilidade da molécula e é mais sensível a título homonuclear, ou seja, moléculas compostas por átomos isótopos. O espectro de tecidos biológicos é na verdade a soma ponderada dos espectros de todas as espécies moleculares do tecido, devido ao fato de apresentarem alto número de moléculas Raman ativas em sua composição.²¹

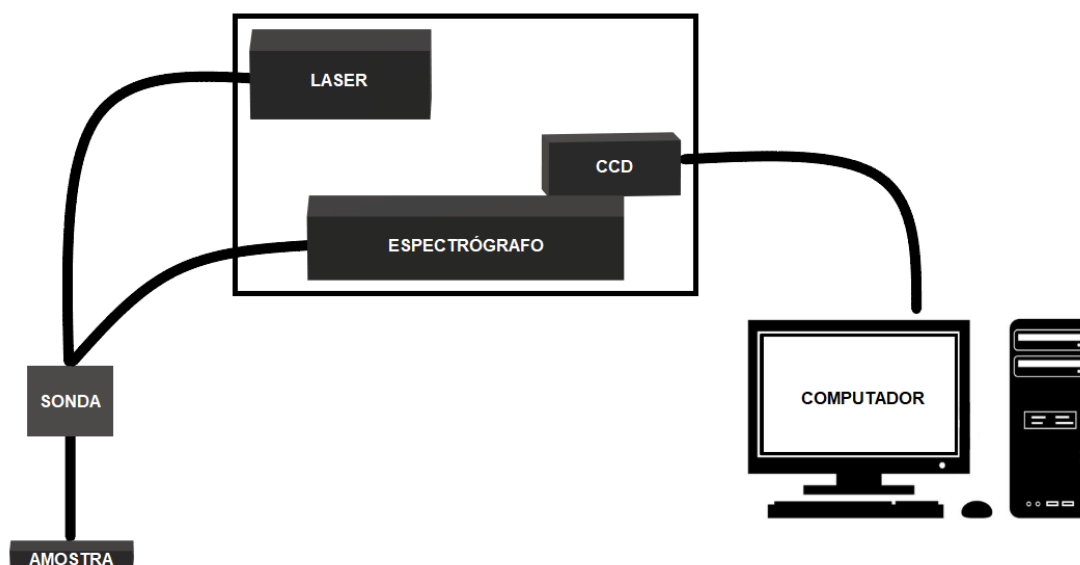
A espectroscopia Raman é apenas um dos métodos de espectroscopia por vibração, bastante útil e eficaz para análise da composição química do tecido ósseo sem comprometimento estrutural da amostra em estudo. Estudam a interação da luz com a matéria assim como as outras formas espectroscópicas existentes. O emprego dessa técnica espectroscópica vibracional, Raman, possibilita a obtenção de informação também sobre propriedades mecânicas ósseas, com base em análises de especificidades espectrais geradas e a possibilidade de investigar a maturidade mineral, como também a integridade do colágeno e água.³²

A espectroscopia Raman é uma técnica capaz de permitir a inspeção de matéria orgânica e inorgânica, além de fornecer informações sobre a composição química da matriz mineral e de colágeno do tecido ósseo.³² Em modelos imprecisos assim como o osso, a medição absoluta da intensidade da banda Raman é bastante complicada. Portanto, a medida Raman geralmente é a taxa de largura da banda, o que incluem a razão mineral/matriz, razão carbonato/fosfato e a razão maturidade do

colágeno. A exceção mais considerável é a cristalinidade, que na maioria das vezes é mensurada pelo inverso da banda fosfato 959 cm^{-1} , geralmente a escolha da banda ou matriz mineral não é importante, a não em casos onde uma banda mais intensa produza resultados mais precisos.²⁷

Uma representação do esquema estrutural da instrumentação Raman é apresentado abaixo. No esquema podem ser vistos o local para posicionamento da amostra, a sonda Raman, a fonte laser, o espectrógrafo que obtém o espectrograma, um detector CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), e um computador responsável por guardar os dados para posterior análise, conforme mostrado na na Figura 12.

Figura 12 - Esquema da instrumentação Raman.

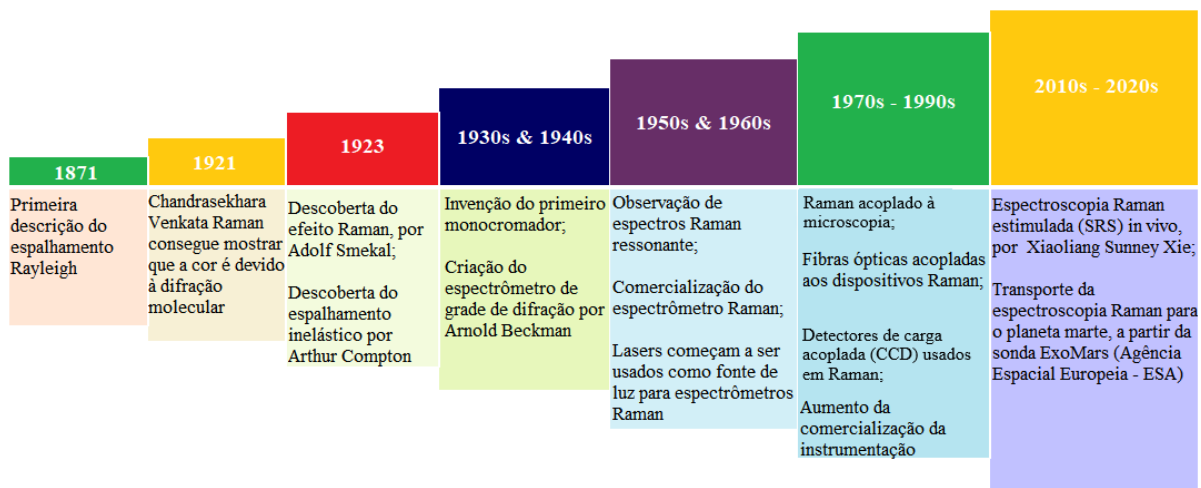


Fonte: Elaborada com base em ³³.

Uma das ferramentas que mais vêm sendo utilizada para a avaliação da qualidade óssea é a espectroscopia Raman, pois no emprego desta técnica pode ser usada amostras de espécimes frescas, ou mesmo protótipos conservados a partir de técnicas de fixação e incorporação como o uso de hidroxiapatita (hidróxido de cálcio- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e solução de hidrogenofosfato de amônio- $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) para preservação óssea³⁴, podendo ser usada inclusive para medição não invasiva *in vivo*. A variabilidade da amostragem deve ser balanceada com a relação sinal-ruído, que costuma ser menor do que na Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do osso, que fornece quase a mesma informação.

Até o momento ainda não houve nenhuma verificação em relação a aquisição de espectros Raman ósseos humanos de uma maneira não invasiva.²⁷ Na Figura 13 podem ser visualizados alguns dos principais ocorridos científicos que contribuíram no desenvolvimento do conhecimento a cerca da espectroscopia Raman.



Figura 13 - Principais acontecimentos que impulsionaram o desenvolvimento da espectroscopia Raman.



Fonte: Elaborada com base em ³⁵.

Algumas vantagens e desvantagens da técnica espectroscópica Raman são exibidas na Tabela 5.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens da espectroscopia Raman.

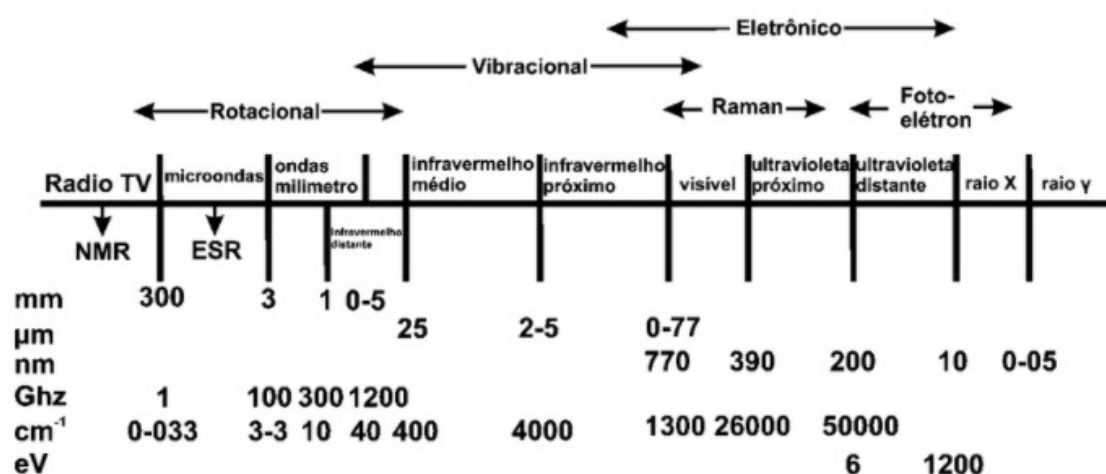
|  |  |
|---|---|
| Relação sinal-ruído mais baixa do que a obtida na espectroscopia por FTIR; | Resolução espacial limitada pela difração; |
| Pode ser usada em amostras frescas, fixadas ou embutidas em compostos como resina; | Fluorescência; |
| Exige pouca ou nenhuma preparação da amostra. | Aberração/refração esférica. |

Fonte: Elaborada com base em ^{27,31 e 36}.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) também é uma forma de análise de amostras compostas por tecido ósseo, essa técnica estuda as interações entre a matéria e a energia eletromagnética na região do infravermelho³⁷ a partir da análise da absorção ou espalhamento da radiação após a interação. Tem o intuito de determinar o grupo funcional do material em observação e identificá-lo ou qualificá-lo, na Figura 14 podemos ver todas as regiões do espectro eletromagnético.

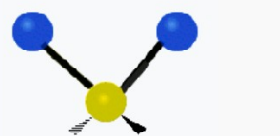




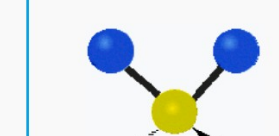
Figura 14 - Espectro eletromagnético.



Fonte: ³⁸.

Assim como a espectroscopia Raman trata-se de uma técnica vibracional, que é uma das formas de obtenção do espectro molecular, sendo as outras: estados de spin eletrônico, rotações moleculares e estados eletrônicos.³⁷ As vibrações que ocorrem devido às ligações das moléculas constituintes do tecido que formam os espectros, os quais podem revelar informações indicativas como a quantidade de conteúdo mineral, conteúdo e maturidade da matriz de colágeno, entre outras.¹⁵ Os tipos de vibrações moleculares são diferenciados em dois modos de estiramento: simétrico e assimétrico e quanto a direção dessas vibrações, na Figura 15 contém alguns tipos de vibrações.

Figura 15 - Diferentes tipos de vibrações.

| | Radial | Latitudinal | Longitudinal |
|-------------------------|---|---|--|
| Estiramento simétrico |  |  Tesoura |  Abanado |
| Estiramento assimétrico |  |  Balanço |  Torção |

Fonte: Adaptado de ³⁹.

Os grupos funcionais são classificados de acordo com o número de onda em que as ligações absorvem, portanto eles se diferenciam entre si por sua frequência característica possibilitando o esclarecimento da estrutura química do material. As bandas referentes a materiais biológicos são exibidas na Tabela 6, no caso específico dos ossos as bandas de maior interesse são as de carbonato (CO_3) e de fosfato (PO_4).

Tabela 6 - Frequências de bandas Raman de interesse ósseo biológico e suas respectivas atribuições.

| Frequência de Banda [cm^{-1}] | Modo de vibração | Atribuições |
|--|-----------------------------|---|
| Estrutura secundária da proteína | | |
| 930-950 | N-C α -C estiramento | Alongamento esquelético/ α -hélice |
| 1235-1259 | Bandas N-H e C-H | Amida III/ β -folha |
| 1260 | Bandas N-H e C-H | Amida III/desordenado |
| 1300-1340 | Bandas N-H e C-H | Amida III/ α -hélice |
| 1650-1655 | Ligamento C=O ligado a H | Amida I/ α -hélice |
| 1670-1680 | Ligamento C=O ligado a H | Amida I/ β -folha e β -barril |
| Resíduos de aminoácidos | | |
| 508-545 | S-S estiramento | Conformadores trans e gauche |
| 655 | C-S estiramento | Conformadores gauche |
| 704 | C-S estiramento | Conformadores trans |
| 835/857 | Ligação H no anel índol | Dubletode tirosina Fermi |
| 875-880 | Ligação H no anel índol | Orientação de triptofano |
| 1008/1034 | Anel fenil | Fenilalanina |
| 1551-1556 | Anel índol | Triptofano |
| 1605 | Anel fenil | Fenilalanina |
| 1615 | Anel índol | Tirosina |

Fonte: Adaptada de ³⁵.

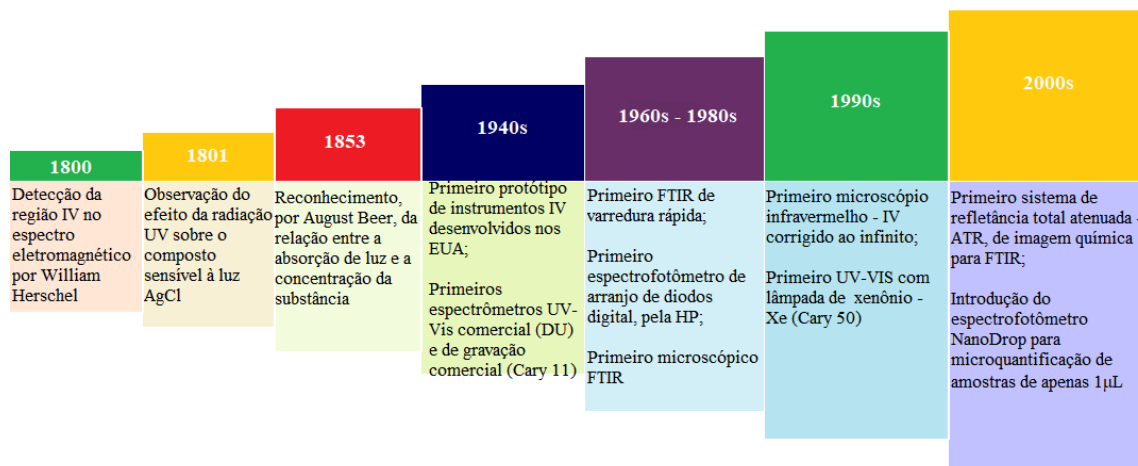
Tabela 6 - Frequências de bandas Raman de interesse ósseo biológico e suas respectivas atribuições. (continuação)

| Frequência de Banda [cm ⁻¹] | Modo de vibração | Atribuições |
|---|---------------------------------------|--------------------------|
| RNA e DNA | | |
| 813-816 | O-P-O estiramento | Forma A de hélice |
| 914-925 | C-O e C-C estiramento | Ribose-fosfato |
| 1095 | PO ₂ estiramento simétrico | Marcadores B-DNA e Z-DNA |
| 1135, 1235, 1395 | Estiramento de anel | Uracila |
| 1174, 1325, 1370 | Estiramento de anel | Guanina |
| 1245, 1275 | Estiramento de anel | Citosina |
| 1256, 1514 | Estiramento de anel | Adenina |
| 1671 | C=O estiramento | Guanina |

Fonte: Adaptada de ³⁵.

Determinados avanços importantes na parte de espectroscopia por FTIR são apresentados na Figura 16.


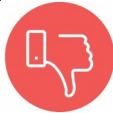
Figura 16 - Principais acontecimentos que impulsionaram o desenvolvimento da espectroscopia por FTIR.



Fonte: Adaptada de ³⁷.

Algumas vantagens e desvantagens da técnica espectroscópica no infravermelho por FTIR são exibidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Vantagens e desvantagens da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

|  |  |
|---|---|
| Coleta dados em alta resolução espectral em uma ampla faixa; | É necessário que haja interação entre a radiação infravermelha e a amostra; |
| Fornecer uma “impressão digital” do composto e/ou de uma modificação molecular; | Poucas informações elementares. |
| Útil para amostras gasosas, líquidas e sólidas. | |

Fonte: Elaborada com base em ^{39, 40 e 46}.

As espectroscopias Raman e no infravermelho são consideradas técnicas complementares, pois em determinados casos a espectroscopia de infravermelho é

mais conveniente enquanto em outros casos a espectroscopia Raman possibilita uma análise mais detalhada das amostras biológicas em estudo.⁴⁰

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Técnicas de ensaios utilizando imagens ópticas estão em desenvolvimento, tendo em conta que essas imagens são úteis para investigações ósseas e relacionadas a metástases esqueléticas, essas ferramentas de análise permitem também a visualização tanto *in vitro* como *in vivo* dos mecanismos moleculares e de aspectos funcionais durante o acompanhamento do câncer.²¹ O emprego de técnicas de espectroscopia e microscopia permitem que os cientistas denotem as mudanças nas propriedades dos cristais e a correspondência da modificação do processo de mineralização e a ocorrência de doenças como a osteoporose, fornecendo assim uma abrangência de campo para a coparticipação entre geoquímicos, mineralogistas

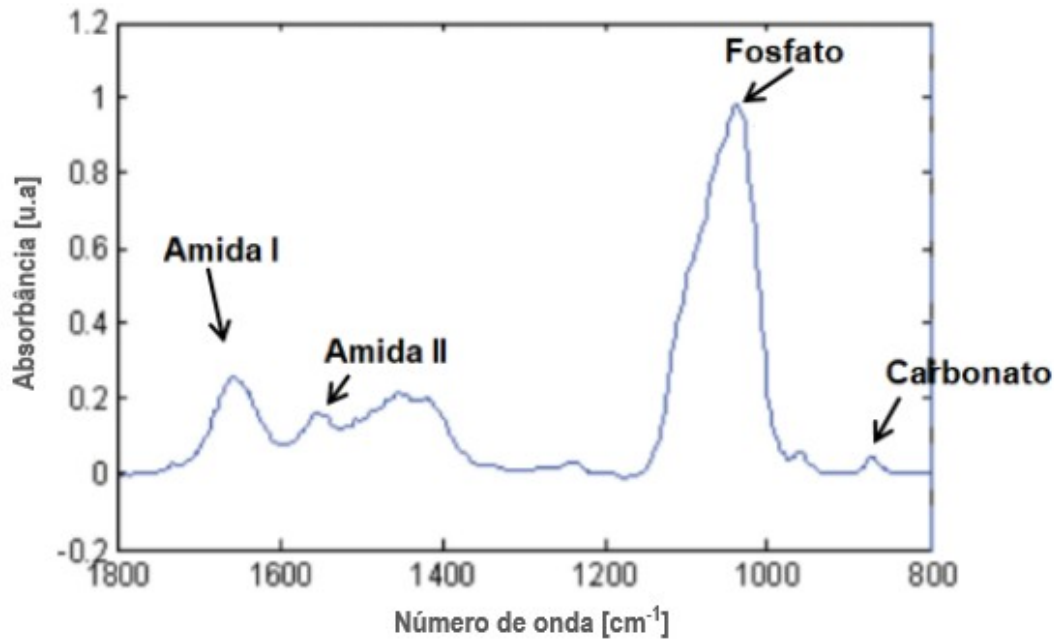
e pesquisadores biológicos e viabilizam excelentes perspectivas para o desenvolvimento de novas terapias.¹⁵

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que imagens adquiridas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por microespectroscopia Raman podem ser usadas para fornecer informações sobre a distribuição espacial de vibrações moleculares, essas vibrações das moléculas estruturais do tecido que geram o espectro de ossos e dentina, por exemplo, indicando a quantidade de decomposição e mudanças no ambiente molecular.

2.1 Raman

A espectroscopia Raman concede informações químicas da estrutura óssea, como o fosfato mineral, carbonato, colágeno da matriz além do teor de água presente no osso em análise. Os minerais fosfato, amida I e carbonato são as ligações mais frequentemente encontradas na matriz óssea, o fosfato ($\approx 959 \text{ cm}^{-1}$) é uma característica da hidroxiapatita-HA: parte mineralizada do osso, enquanto a amida I ($1616\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$) e o carbonato (1070 cm^{-1}) fazem parte da estrutura do colágeno. Proporções do tipo carbonato/fosfato ou colágeno podem ser feitas com o intuito de avaliar o processo de remodelação óssea, e com o fim de notar as possíveis composições tendenciosas que amostras modelo, com evidência de doença, possam apresentar.²¹ Na Figura 17 podem ser visualizadas as bandas de vibração usadas para o cálculo dos parâmetros moleculares e matriciais do tecido ósseo.

Figura 17 - Espectro peculiar de ossos.

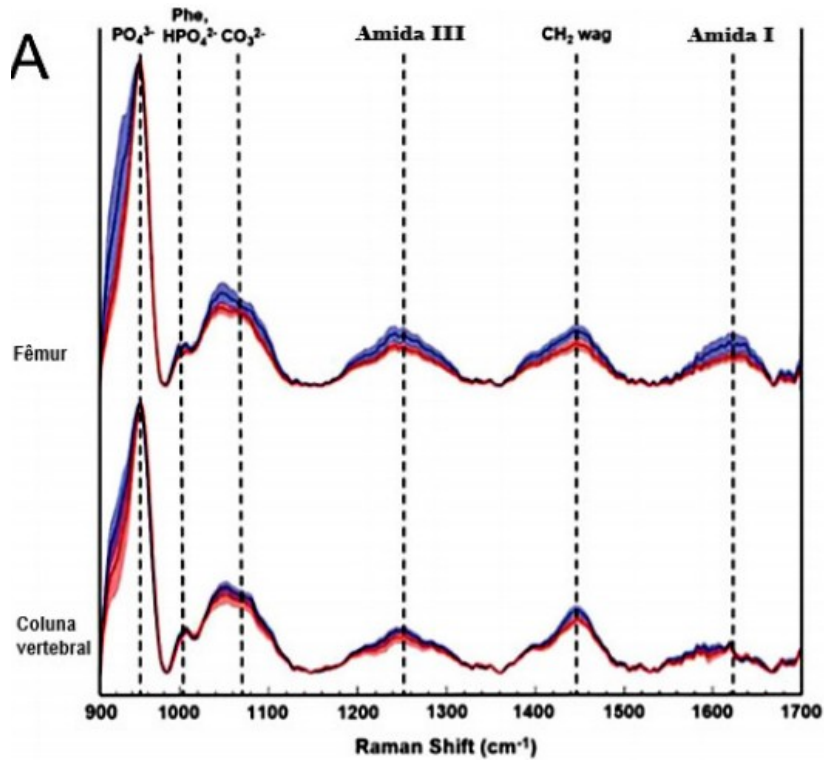


Fonte: Adaptada de ¹⁵.

O osso é considerado um dos locais metastáticos mais comuns a apresentarem doenças malignas, cerca de 600.000 casos de metástases ósseas são diagnosticadas por ano nos EUA em pessoas com mais de 40 anos de idade.²¹ A espectroscopia Raman cada vez mais está sendo usada em investigações das propriedades mecânicas do osso em nível tecidual, fornece informações sobre a cristalinidade mineral óssea (dureza óssea) e sobre os componentes do colágeno presente na matriz, sobre efeitos de várias proteínas da matriz nas propriedades do material ósseo e também quanto a orientação dos cristalitos minerais em relação ao eixo de fibrila de colágeno.²⁷ Nas Figuras 18 e 19 são apresentados espectros Raman obtidos em amostras de osso de camundongos com câncer primário e com metástase, com destaque das principais posições das bandas de colágeno e mineral ósseo associadas as regiões espectrais as mesmas.

Figura 18 - Espectroscopia Raman em câncer ósseo primário e em metástase. A) Espectros Raman adquiridos de fêmures e colunas vertebrais afetados por câncer metastático, os espectros (normalizados para o pico PO_4^{3-})

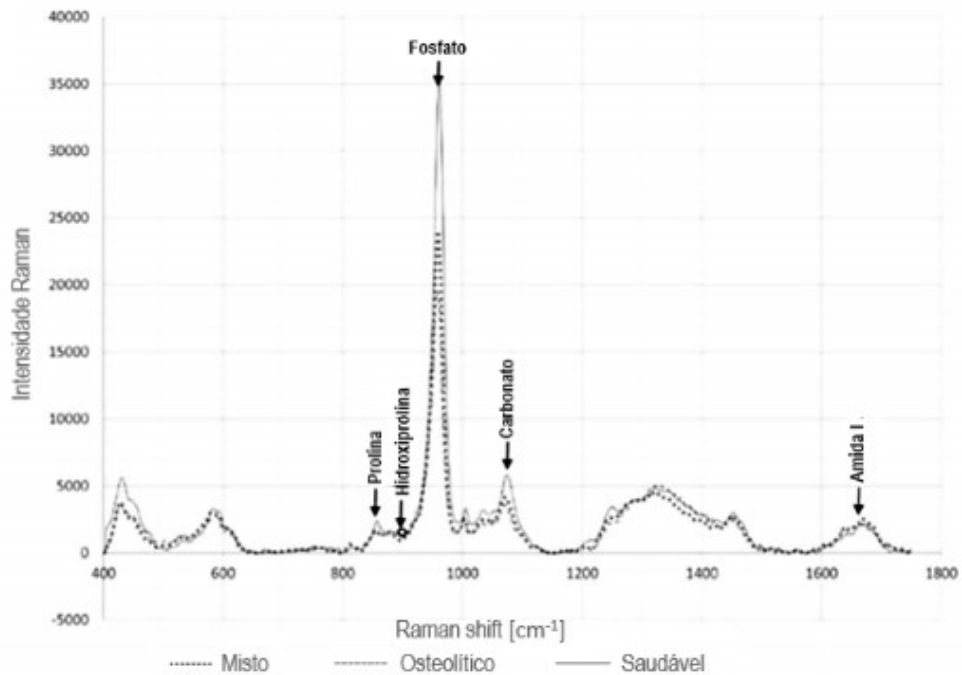
foram adquiridos do grupo de controle da semana 0 (azul) e 5 semanas após a inoculação do tumor (vermelho). As linhas sólidas representam o espectro médio de cada grupo de amostra com sombreamentos associados representando ± 1 desvio padrão. Os picos Raman distintos em 958, 1004, 1070, 1250 e 1450 cm^{-1} sugerem mudanças na substituição de carbonato, mineralização geral, bem como aumentos de cristalinidade em ossos com tumor.



Fonte: Adaptada de ²¹.

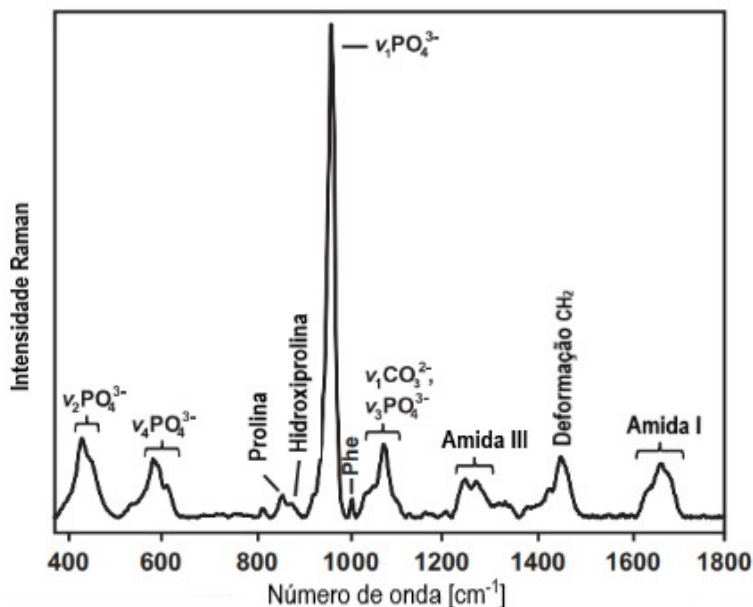
Figura 18 - B) Espectros Raman de colunas vertebrais de camundongos saudáveis e camundongos que passaram pela inoculação de câncer prostático

ou cervical, que produzem metástases osteolíticas ou mistas (osteolíticas e osteoblásticas), respectivamente.



Fonte: Adaptada de ²¹.

Figura 19 - Espectro Raman corrigido pela linha de base do osso cortical de camundongo obtido na configuração com um laser de 785 nm.



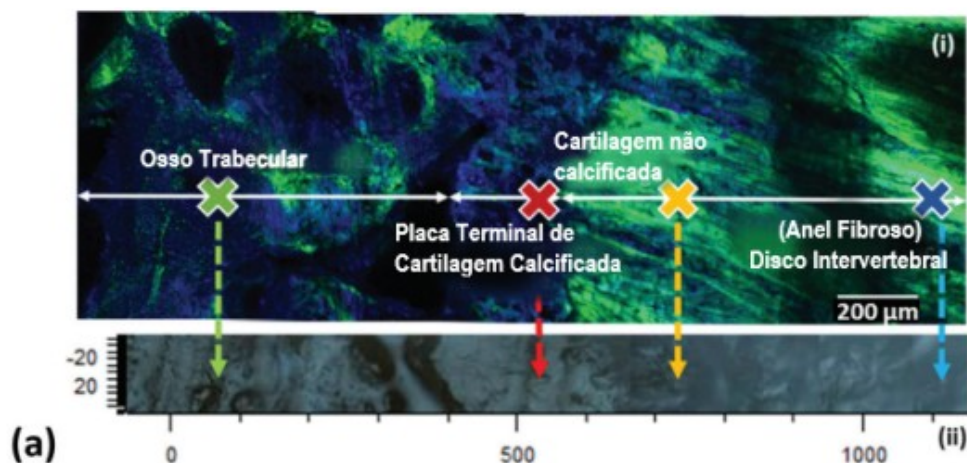
Fonte: Adaptada de ²⁷.

Nas figuras 18-B e 19 são retratados espectros Raman característicos de osso. Pode-se notar que a o intervalo de comprimento de onda interessante para esse caso é de 400-1750 cm^{-1} , a qual inclui as principais bandas peculiares de

mineral ósseo e matriz óssea com exceção de C-H e N-H ($2900-3300\text{ cm}^{-1}$). As principais bandas minerais e matriciais encontram-se de forma resumida na Tabela 8.

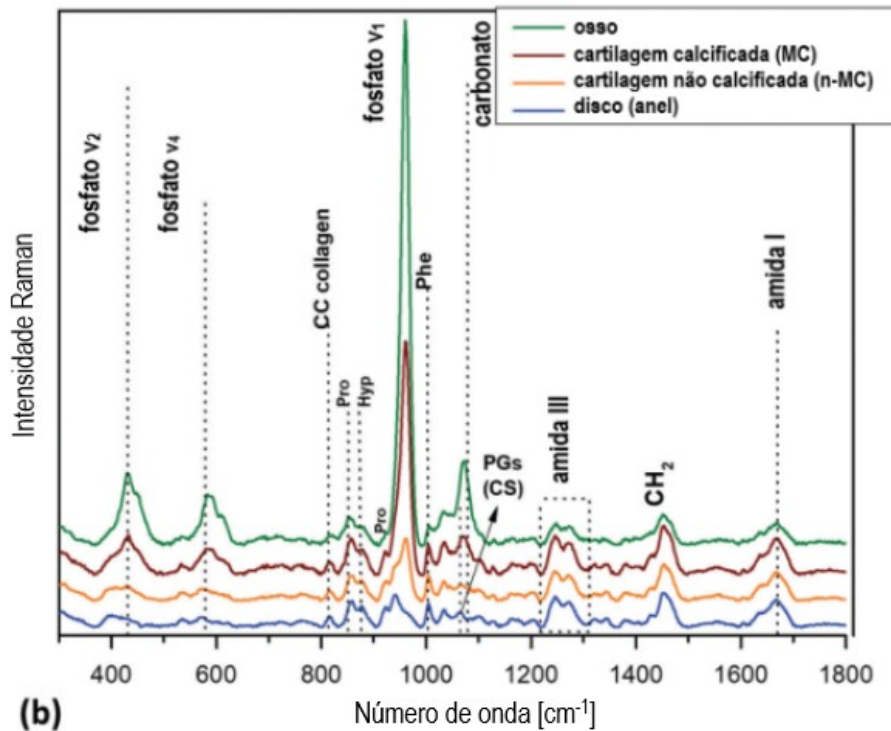
No trabalho realizado por Crawford-Maning, F. et al.⁴¹ foram estudadas amostras vertebrais bovinas incorporadas a solução tamponada de fosfato (PBS) congelada, para que fosse mantida a hidratação evitando o encolhimento das mesmas. A utilização da espectroscopia Raman aliada a técnica microscópica multifotônica permitiu a obtenção de informações importantes posteriormente ao emprego de razões espectroscópicas normalizadas (evita a interferência nos valores absolutos das bandas), incluindo características morfológicas do tecido mineralizado das áreas de interesse (ROI) como é apresentado na Figura 20.⁴¹

Figura 20 - Aquisições Raman obtidas de uma seção vertebral bovina. a) Conjunto de luz branca mostrado em: a(i) enquanto utiliza imagem multifotônica como guia: a (ii). As marcas X indicam a localização de espectros típicos para cada área de interesse (osso trabecular, cartilagem calcificada (MC), cartilagem não calcificada (n-MC) e disco sob o anel fibroso).



Fonte: Adaptada de ⁴¹.

Figura 20 - b) Espectros Raman característicos adquiridos das áreas de interesse designadas em (a). O fundo espectral foi removido, enquanto as intensidades Raman e o deslocamento espectral foram ajustados para melhor clareza.



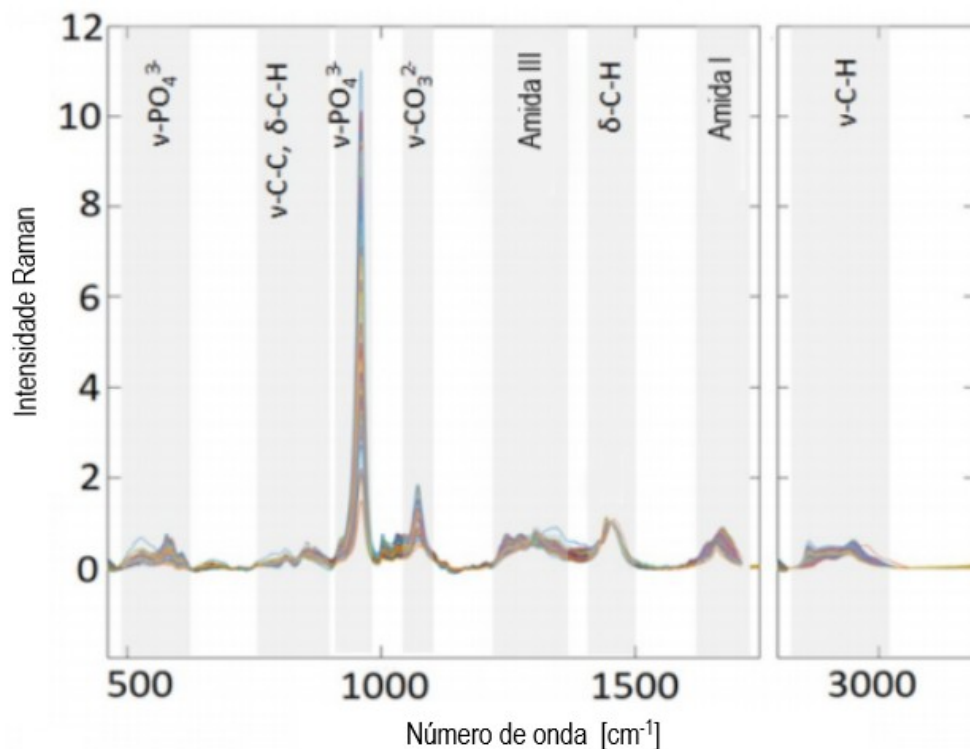
Fonte: Adaptada de ⁴¹.

Os investigadores identificaram as bandas fosfato (959 cm^{-1}) e carbonato de hidroxapatita (1074 cm^{-1}) na região do osso e na parte colágena, não mineralizada, as bandas reconhecidas se referem a prolina/hidroxiprolina C-C ($854, 873\text{ cm}^{-1}$), proteoglicanos ($1063, 1378\text{ cm}^{-1}$), amida III ($1220\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$) e a amida I ($\approx 1665\text{ cm}^{-1}$).

A proporção mineral/matriz (MMR) é responsável por indicar o nível de mineralização do tecido, que geralmente é mais alto na zona final da placa e corresponde ao principal componente da matriz óssea (colágeno tipo I), portanto Raman permitiu a identificação de regiões mineralizadas e não mineralizadas, bem como as mudanças composicionais e estruturais na placa terminal óssea bovina, e a idade óssea a partir da análise de carbonato que é relacionado com a remodelação óssea.⁴¹

A espectroscopia Raman foi capaz de constatar que há diferenças no osso cortical osteoartítico relacionadas tanto à idade como ao sexo dos pacientes.⁴² Os espectros obtidos de amostras de osso cortical com osteoartrite (OA) de pessoas com idade entre 47-82 anos são apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Sobreposição de espectros Raman obtidos de 18 amostras ósseas. Os espectros foram processados com aplicação de correção de linha de base, suavização e normalização para o modo de deformação C-H dos grupos $-CH_2$ a 1450 cm^{-1} , comum a proteína e lipídios. A região $1780\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ foi excluída devido a falta de informações de interesse nessa faixa espectral.

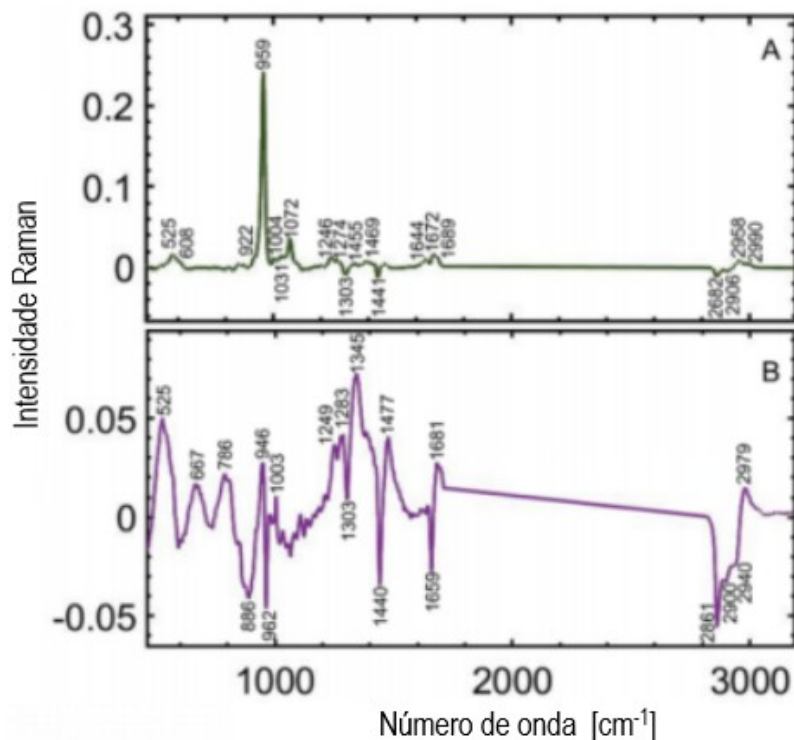


Fonte: Adaptada de ⁴².

A partir dos espectros (Figura 21) foi realizada uma análise dos principais componentes de interesse para verificar as diferenças entre as amostras investigadas, tal observação pode ser visualizada na Figura 22.

Figura 22 - Análise dos principais componentes (PCA) mostrando as intensidades relativas das bandas em função do comprimento de onda. A) Cargas para o grupo de acordo com a idade PC1 e B) para PC2 (grupo de amostras de acordo com idade e sexo), a partir de PCA de 158 espectros registrados das 18

amostras de osso cortical. As cargas positivas em (A) estão associadas a homens e mulheres mais jovens, e as cargas negativas estão associadas a homens e mulheres mais velhos. (B) mostra as cargas positivas e negativas que diferenciam as amostras dentro de cada grupo.



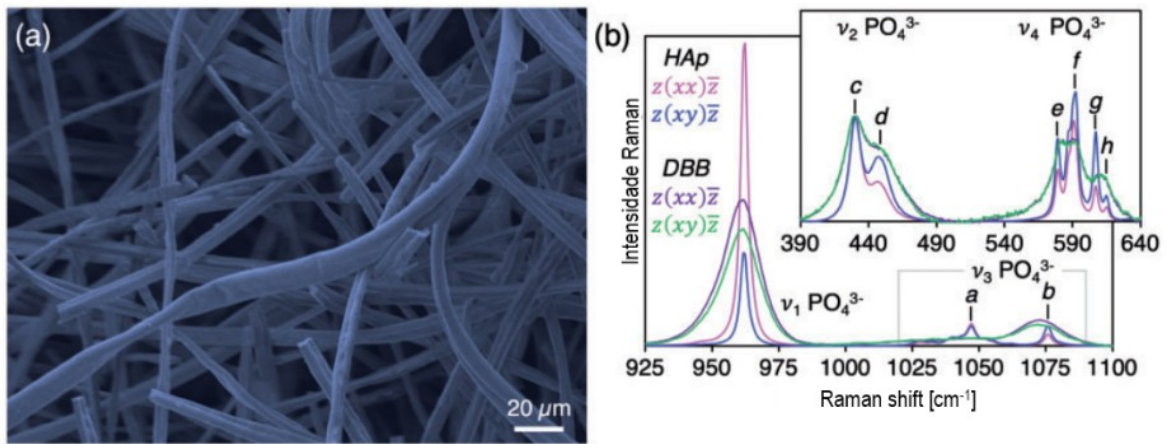
Fonte: Adaptada de ⁴².

Não foi constatada nenhuma diferença significativa entre homens e mulheres jovens além de indiferença na densidade mineral óssea (DMO), enquanto as amostras de ossos femininos mais velhos apresentaram MMR maiores, maiores razões $\text{CO}_3\text{-PO}_4^{3-}$ e menor conteúdo mineral em relação aos modos de deformação de lipídio/colágeno -CH_2 em 1450 cm^{-1} , comparado a ossos masculinos e feminino mais velhos e mais jovens.⁴²

Com a finalidade de observar as diferenças entre amostras mineralizadas e não mineralizadas por espectroscopia Raman foram utilizadas amostras de hidroxiapatita sintética e osso bovino desproteínizado. Na Figura 23 podem ser observadas a hidroxiapatita vista por um microscópio eletrônico de varredura e os espectros Raman obtidos.

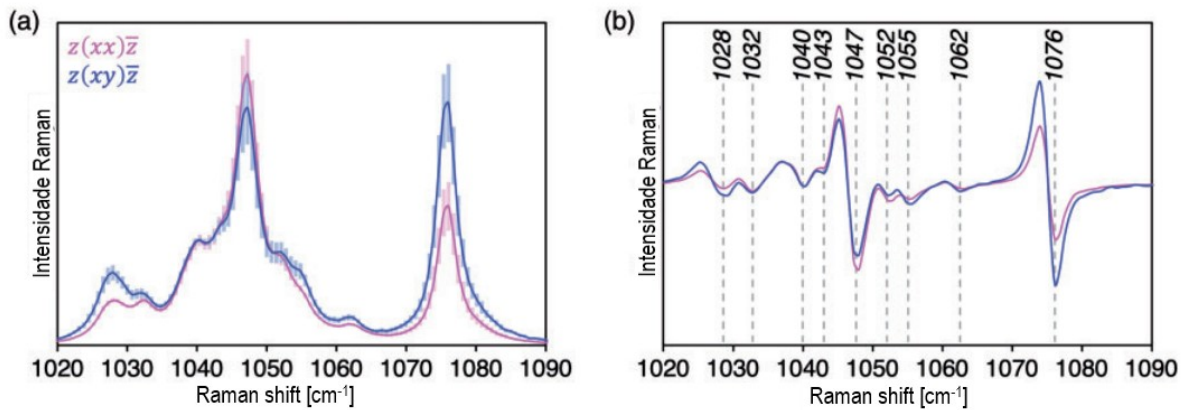
Figura 23 - a) Fibras de hidroxiapatita sintética (HAp), na ordem de μm , observadas na microscopia eletrônica de varredura. b) As bandas $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ e $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ em fibras de HAp (magenta e azul) e osso bovino desproteínizado (DBB; roxo e

verde). Espectros Raman médios normalizados para o subcomponente PO_4^{3-} de 428 cm^{-1} .



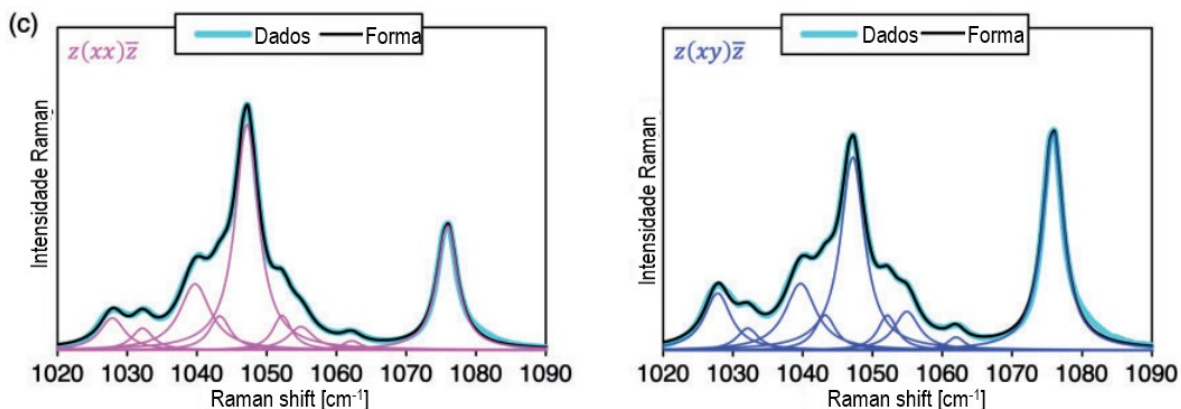
Fonte: Adaptada de ⁴³.

Figura 24 - a) A banda PO_4^{3-} nas configurações $z(xx)z$ (magenta) e $z(xz)z$ (azul). Os espectros Raman médios normalizados para o subcomponente de 428 cm^{-1} e os desvios padrão são mostrados. b) Espectros da segunda derivada.



Fonte: Adaptada de ⁴³.

Figura 25 - c) Ajuste de curva Lorentziana.



Fonte: Adaptada de ⁴³.

Uma pesquisa realizada com mulheres osteopênicas (perda de massa óssea) com e sem fraturas utilizando a espectroscopia Raman, constatou que a razão MMR não possui nenhuma alteração significativa quando comparado os dois grupos amostrais. A principal diferença observada nos espectros foi a alteração na organização das fibrilas de colágeno (mineralizadas), portanto as razões de parâmetros Raman $1244 / 1268 \text{ cm}^{-1}$ e $1044 / 959 \text{ cm}^{-1}$ oferecem auxílio no diagnóstico de mulheres com suspeita de fraturas.⁴⁵ A estratégia de utilização da espectroscopia Raman também é útil na avaliação da qualidade e quantidade da matriz óssea, a partir da investigação das propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical que pode ser realizada por meio da avaliação de espectros derivados.⁴⁶

Tabela 8 - Principais bandas minerais e matriciais visíveis no espectro Raman para o osso.

| Raman shift [cm^{-1}] | Atribuição | Comentários |
|----------------------------------|-------------------------|--|
| 430 | $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ | Banda forte |
| 450 | $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ | Ombro na banda 430 cm^{-1} |
| 584-590 | $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ | Vários componentes parcialmente resolvidos |

Fonte: Adaptada de ²⁷.

Tabela 8 - Principais bandas minerais e matriciais visíveis no espectro Raman para o osso. (continuação)

| Raman shift [cm ⁻¹] | Atribuição | Comentários |
|---------------------------------|-------------------------|---|
| 609 | $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ | Ombro na banda 590 cm ⁻¹ |
| 668 | $\nu(\text{C-S})$ | Cisteína |
| 756 | $\nu_4\text{CO}_3^{2-}$ | Carbonato tipo B, muito fraco |
| 853 | $\nu(\text{C-C})$ | Prolina de colágeno, pode incluir contribuição $\delta(\text{C-C-H})$ da tirosina |
| 872 | $\nu(\text{C-C})$ | Principalmente colágeno hidroxiprolina |
| 920 | $\nu(\text{C-C})$ | Principalmente colágeno prolina |
| 937 | $\nu(\text{C-C})$ | Prolina e proteína da coluna vertebral |
| 955 | $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ | Fase mineral óssea transitória (P-O), geralmente imaturo |
| 957 | $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ | Mineral ósseo contendo HPO_4^{2-} extenso, geralmente imaturo |
| 959-962 | $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ | Mineral ósseo, maduro |
| 1003 | $\nu(\text{C-C})$ | Fenilalanina |

Fonte: Adaptada de ²⁷.

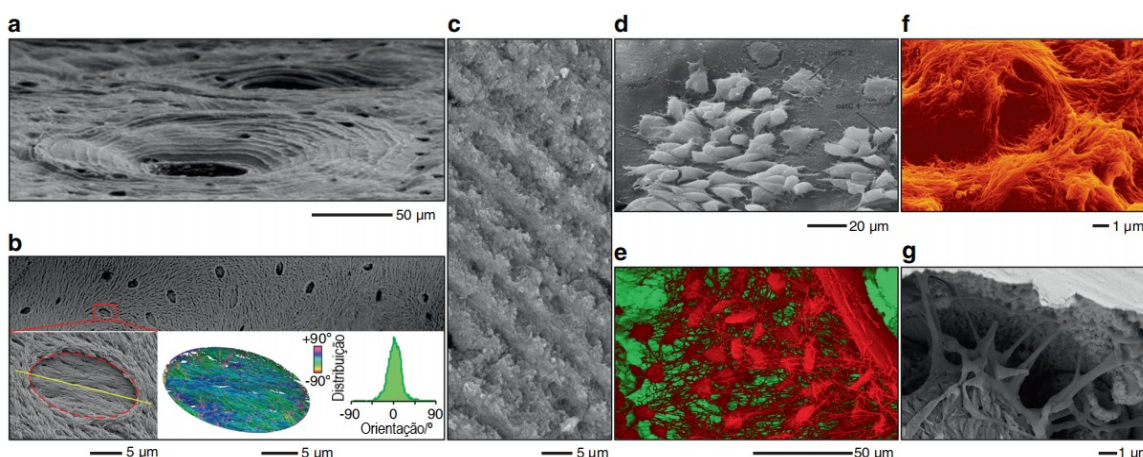
Tabela 8 - Principais bandas minerais e matriciais visíveis no espectro Raman para o osso. (continuação)

| Raman shift [cm ⁻¹] | Atribuição | Comentários |
|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| 1035 | $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ | Sobrepõe-se ao componente prolina $\nu(\text{C}-\text{C})$ |
| 1048 | $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ | |
| 1060 | Proteoglicano | Sobrepõe-se a lipídios, colágeno e componentes de $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ |
| 1070 | $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ | Sobrepõe-se a componentes de $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ |
| 1076 | $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ | Sobrepõe-se a componentes de $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ |
| 1176 | $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ | Tirosina, fenilalanina |
| 1204 | $\omega(\text{CH}_2)$ | Tirosina, hidroxiprolina |
| 1242 | Amida III | Proteína folha- β e bobinas aleatórias |
| 1272 | Amida III | Proteína α -hélice |
| 1293-1305 | $\delta(=\text{CH})$ | Faixa lipídica, às vezes observada em osso fresco não tratado |
| 1340 | Amida III | Proteína α -hélice, às vezes chamada de abano CH_2CH_2 |

Fonte: Adaptada de ²⁷.

A preparação das amostras é uma etapa fundamental para a análise espectroscópica. É possível com a preparação adequada realizar remoções seletivas e/ou aplicar técnicas de preservação garantindo que o tecido poderá ser utilizado e não terá suas propriedades alteradas. Da mesma forma pode ser realizada uma discriminação entre matéria orgânica e inorgânica sempre dentro dos objetivos propostos para o trabalho. Com a finalidade de apresentar alguns dos protocolos existentes para remoção e manutenção dos tecidos inserimos uma tabela para visualização e análise. Na Figura 26 são retratadas algumas imagens, após a exposição a compostos químicos às amostras.

Figura 26 - Remoção seletiva e/ou preservação de componentes teciduais específicos. a) Padrão lamelar osteonal realçado por ataque ácido com ácido cítrico. b) Lacunas de osteócitos osteoblásticos na superfície do osso trabecular tratado com NaOCl. c) Superfície fraturada e desproteïnizada pelo calor. Layout ordenado de cristais minerais dispostos em uma sequência concêntrica de cristais e ranhuras. d) Superfícies subjacentes de células de revestimento destacadas por ultrassom expostas após tratamento com OsO_4 e $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Dois tipos morfológicos são reconhecidos: 1-células em forma de cúpula convexa com uma borda não aderente (“ostC1”; $52,5 \mu\text{m}^2$ por célula) e 2-células achatadas na superfície do osso com propagação equatorial, processos citoplasmáticos (“ostC2”; $179 \mu\text{m}^2$ por célula). e) Molde multicamadas da rede de osteócitos e vasculatura obtida por exposição prolongada e repetida a soluções de HCl e KOH. f) Colágeno exposto a ataque ácido com HCl após a separação mecânica do implante ósseo embebida em resina, oposto diretamente à superfície do implante. g) Revelação da fixação de osteócitos na superfície de um implante cp-Ti ablacionado a laser, a partir do condicionamento com molde de resina. As características topográficas finas da superfície do implante foram mantidas intactas após a exposição ao H_3PO_4 e ao NaOCl.



Fonte: Adaptada de ¹².

Shah, F. A. et al. (2019)¹², reuniram diferentes protocolos utilizando inúmeros reagentes, para o mesmo propósito, remoção e/ou preservação de componentes ósseos específicos (fase orgânica, fase inorgânica, conteúdo celular e interface osso-implante) para cada caso e objetivo os quais são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Protocolos de preparação de amostras para remoção seletiva e/ou preservação de componentes de tecido específicos.

| Aplicação | Reagentes, tempo, temperatura |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Fase orgânica</i> | |
| Superfície do osso trabecular | 0.6 N HCl, 6 dias |
| Padrão lamelar em osso osteonal | 6 % ácido cítrico, 2 min |
| <i>Fase inorgânica</i> | |
| Superfície do osso trabecular | 2.6 % NaOCl, 14 dias |
| Lacunas de osteócitos osteoblásticos | 5 % NaOCl, 3 dias |

Fonte: Adaptada de ¹².

2.2 Espectroscopia por FTIR

A imagem óptica na primeira janela da região do infravermelho (650-950 nm) do espectro eletromagnético é utilizada também em pesquisas pré-clínicas de câncer esquelético, sabendo que tais imagens carregam informações funcionais e estruturais do osso e de tumores dentro desse microambiente ósseo.²¹

Em combinação com as técnicas de ultrassom, tomografia computadorizada (CT), tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e ressonância magnética (MRI), a imagem ópticas oferece uma tradução clínica rápida permitindo como que haja um acompanhamento em tempo real do crescimento do tumor e interações estromais em níveis funcional, estrutural e molecular tornando a investigação de metástases ósseas mais aprofundada. Assimilar os mecanismos relacionados tanto à metástases ósseas

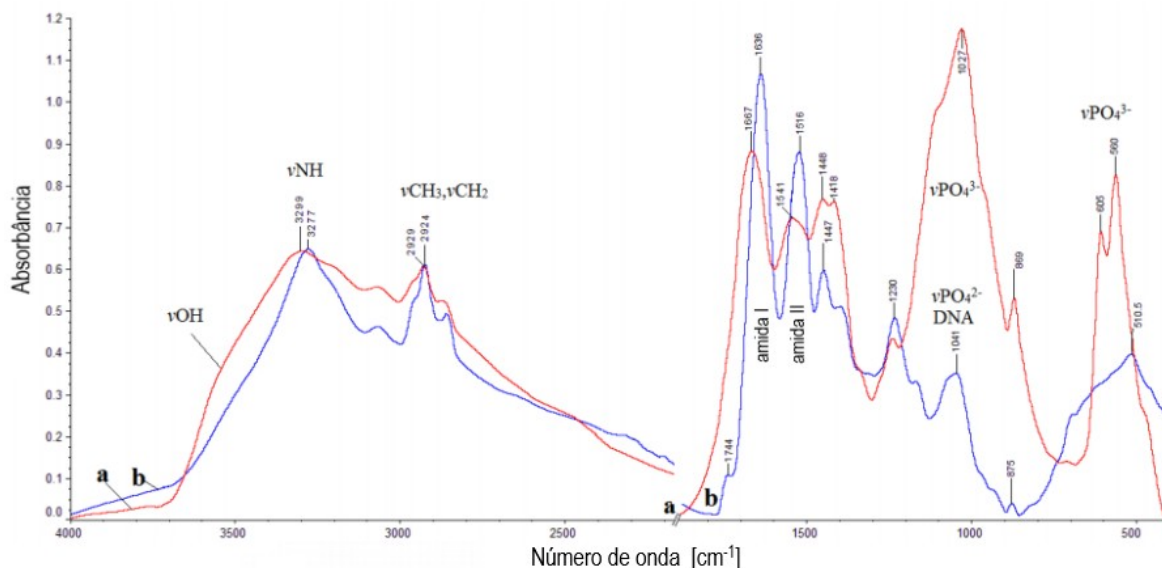
quanto ao câncer esquelético é fundamental para que seja desenvolvidas e aprimoradas técnicas de monitoramento terapêutico *in vivo*.⁴⁰

As bandas minerais que aparecem no espectro Raman são as mesmas que aparecem no espectro FTIR apesar de diferirem em intensidade, suas posições variam com alguns fatores como a idade, estado de saúde e as diferenças entre seres humanos e os modelos animais utilizados nas pesquisas, além de possíveis erros instrumentais e má calibração do equipamento. A banda fenilalanina que apresenta-se clara no espectro Raman (1003 cm^{-1}) é fraca/ausente em espectros FTIR, enquanto a amida II é visível nos espectros FTIR ($1540\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$) e ausente no espectro Raman, por exemplo.²⁷

A eficácia da transferência de energia para a molécula é a principal diferença entre Raman e FTIR, para que a absorção infravermelha decorra é preciso haver uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula (ligações polares com sinais maiores que as ligações não polares), enquanto no espalhamento Raman a variação deve ocorrer no momento de dipolo induzido (sinais Raman mais sólidos das ligações não polares em relação as ligações polares).³¹

No trabalho realizado por Anastassoupoulou, J. et al. (2015)⁴⁶, foi utilizado o espectrômetro Transform Infrared (FT-IR) Nicolet 6700 (requer pouca quantidade amostral: microgramas- μg e não destrutivo) conectado a um acessório de reflexão total atenuada (ATR) para registrar as mudanças conformacionais e moleculares de amostras ósseas de pacientes (39 e 65 anos) com câncer de mama metastático, um acometimento propício a recorrência, e que foram submetidas a uma reconstrução com aloenxerto osteoarticular, além de uma pequena quantidade de ossos frescos (esponjosos ou compactos) que foram imersos sucessivamente em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e em acetona para que o tecido adiposo e os cromóforos sanguíneos do osso fossem reduzidos ao máximo. O espectro gerado é a soma de todas as frequências dos componentes presentes nas amostras e fornece informações sobre todos os componentes simultaneamente como é apresentado na Figura 27.⁴⁶

Figura 27 - Espectros FT-IR de a) osso saudável (vermelho) e b) osso canceroso (azul) de uma mulher de 59 anos com câncer ósseo metastático de câncer de mama no local original.



Fonte: Adaptada de ⁴⁶.

A comparação dos dois espectros mostrou mudanças consideráveis em toda a faixa espectral de 3600-400 cm^{-1} , a intensidade da faixa do ombro perto de 3550 cm^{-1} para ossos saudáveis foi reduzida ou desapareceu nos ossos cancerosos, essa banda era dupla com máximos em 3515 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , os quais são dominados pela absorção da vibração de alongamento dos grupos funcionais relativos a água e a hidroxiapatita, respectivamente. As intensidades dessas bandas são sensíveis na desmineralização dos ossos devido ao câncer e podem mostrar o progresso da osteólise. A banda larga na região 3300-3000 cm^{-1} é formada a partir das duas bandas em 3209 cm^{-1} e 3187 cm^{-1} , atribuídas às vibrações NH, no espectro de osso canceroso a banda em 3209 cm^{-1} mudou para comprimentos de onda mais altos em 3277 cm^{-1} e 3187 cm^{-1} e foi reduzida em intensidade, mas não foi alterada. Em ossos cancerosos a ligação de proteínas mudou estruturalmente e não deram nenhuma ligação de hidrogênio inter nem intramolecular da ligação de hidrogênio NH, conduzindo a conclusão de que realmente ocorre a descalcificação e, que a doença altera a estrutura molecular secundária das proteínas.⁴⁷

3 SOFTWARE *irAnalyze-RAMalyze*

Desenvolveu-se um guia, logo abaixo, contendo o passo a passo das principais ferramentas de um programa de interpretação de dados espectrais, para que recentes investigadores dessa área de pesquisa possam realizar o pré processamento dos dados espectrais sem dificuldade.

O software *irAnalyze-RAMalyze* é a combinação de dois programas de análise de dados espectrais de infravermelho e Raman, permitindo a análise dos grupos funcionais desses espectros. Trata-se de um recurso disponibilizado gratuitamente durante um período de avaliação (30 dias) pré-compra, o qual oferece acesso ilimitado aos recursos. O download pode ser realizado, após o preenchimento de alguns dados como o email do usuário.

Para registro e download pode ser acessado o link abaixo:

<https://downloads.labcognition.com/PanoramaSetup/irAnalyze-RAMalyzeSetup.zip>

Elaborou-se um guia passo a passo de interpretação dos dados de IR com *irAnalyze* e Raman com *RAMalyze* e suas respectivas funcionalidades.

3.1 Instalação do software

1- Salvar o arquivo ZIP baixado (exibido na Figura 28 abaixo) no disco rígido local.

Figura 28 - Arquivo ZIP baixado.

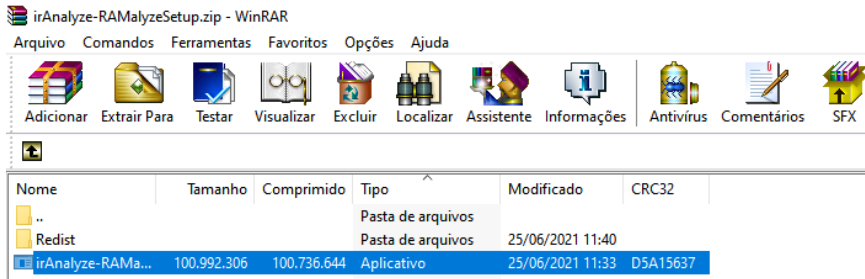


| | | | |
|---|------------------|----------------------|----------|
|  irAnalyze-RAMalyzeSetup | 02/07/2021 15:49 | Arquivo ZIP do Wi... | 8.400 KB |
|---|------------------|----------------------|----------|

Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

2- Descompactar o arquivo ZIP, utilizando algum programa de descompactar arquivos, por exemplo o “*WinRAR*” e iniciar o programa com clique duplo no arquivo *setup.exe*, como apresentado na Figura 29.

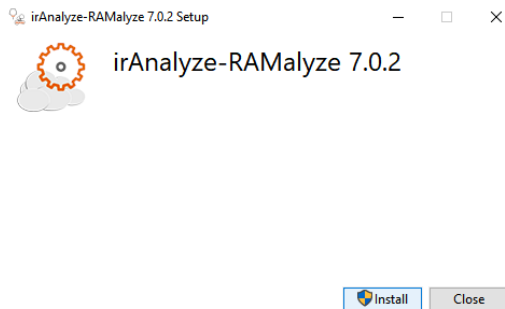
Figura 29 - Descompactação do arquivo ZIP baixado, utilizando o WinRAR.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

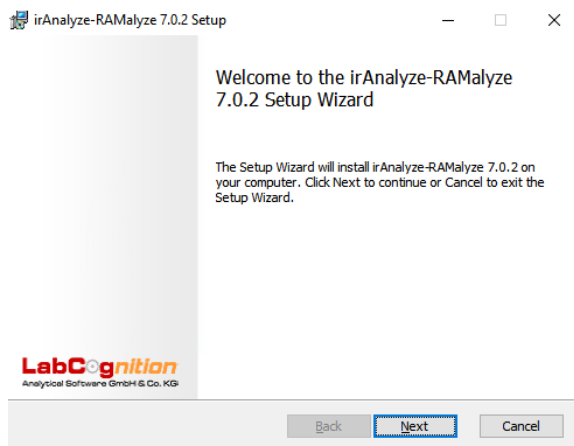
3- Seguir as etapas do assistente de instalação para terminar o processo (Figuras 30 a 36).

Figura 30 - Etapas de instalação do programa.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 31 - Etapas de instalação do programa.



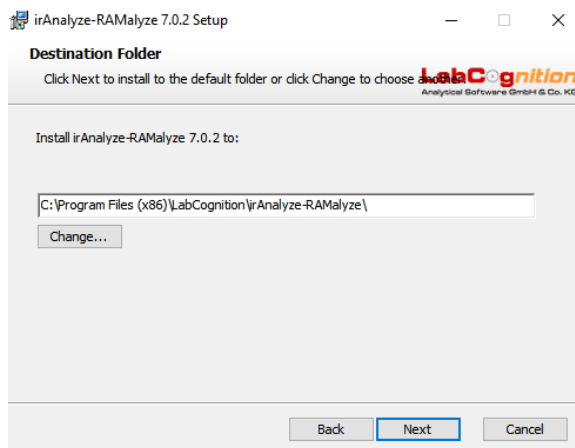
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 32 - Etapas de instalação do programa.



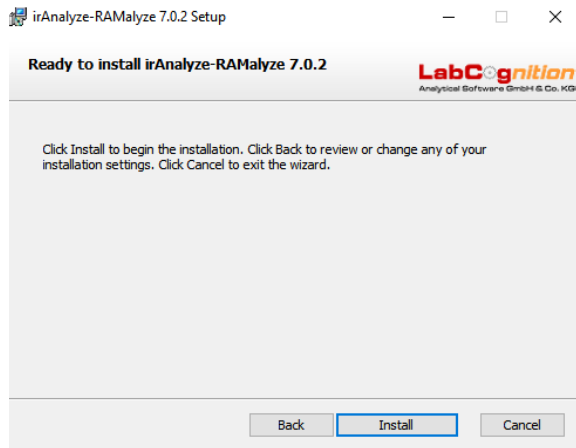
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 33 - Etapas de instalação do programa.



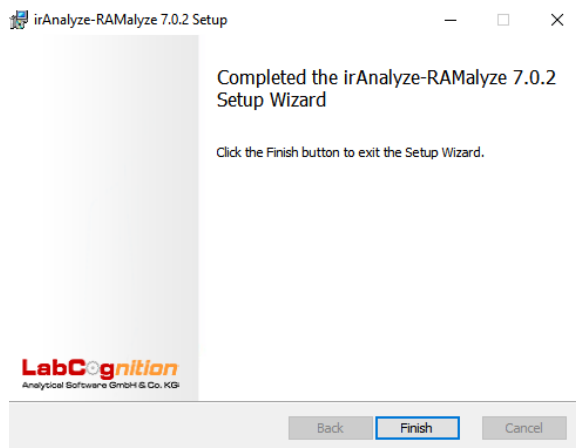
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 34 - Etapas de instalação do programa.



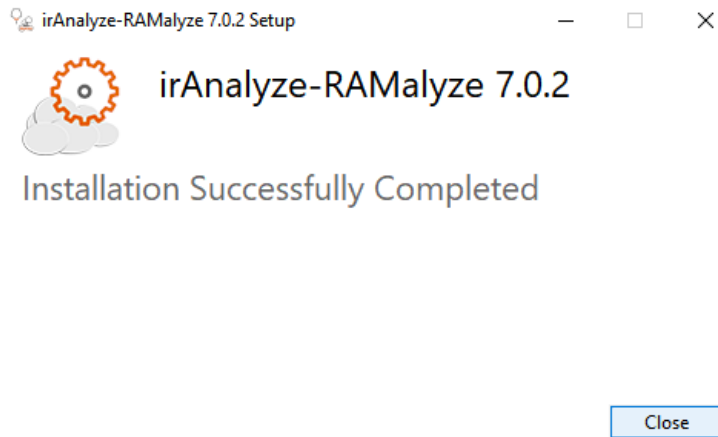
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 35 - Etapas de instalação do programa.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 36 - Etapas de instalação do programa.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

4-Após a instalação bem-sucedida, dar um clique duplo no ícone do aplicativo na área de trabalho para iniciar o software como é mostrado na Figura 37.

Figura 37 - Ícone do programa.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

5-Iniciar o software, assim como é mostrado na Figura 38.

Figura 38 - Janela pré abertura do programa.

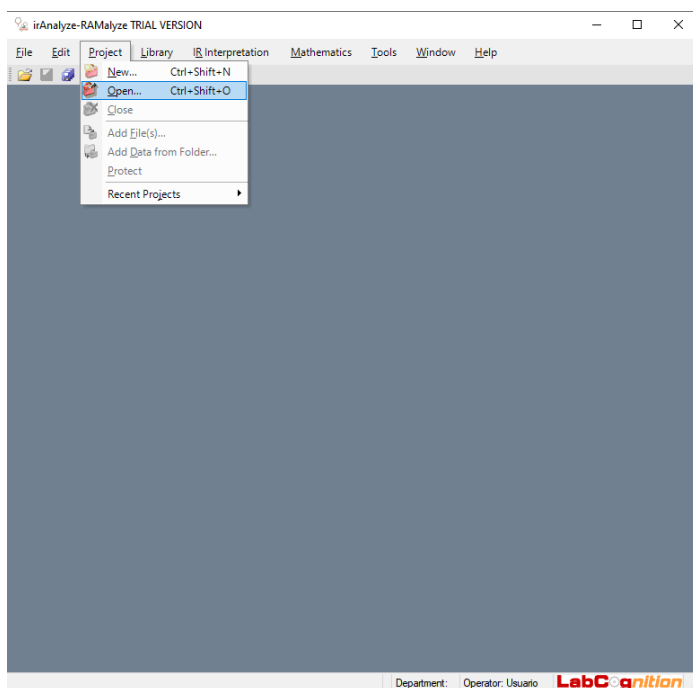


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3.2 Inicialização

1-Depois de iniciar o software, clicar em “Abrir Projeto” no menu “Projeto”, como é mostrado na Figura 39.

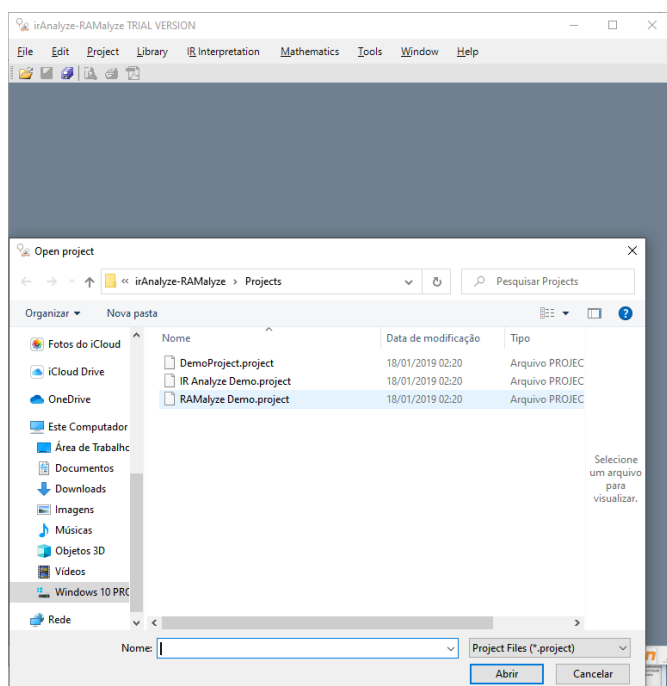
Figura 39 - Iniciando um projeto.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

2- Há três arquivos demonstrativos que são instalados juntos com o programa e ficam na pasta, para possibilitar a análise e interpretação espectral: “*IR AnalyzeDemo.project*”, “*RAMalyzeDemo.project*” e “*DemoProject.project*”. Esses arquivos devem ser selecionados, um por vez, e abertos seguindo o passo retratado na Figura 40 abaixo.

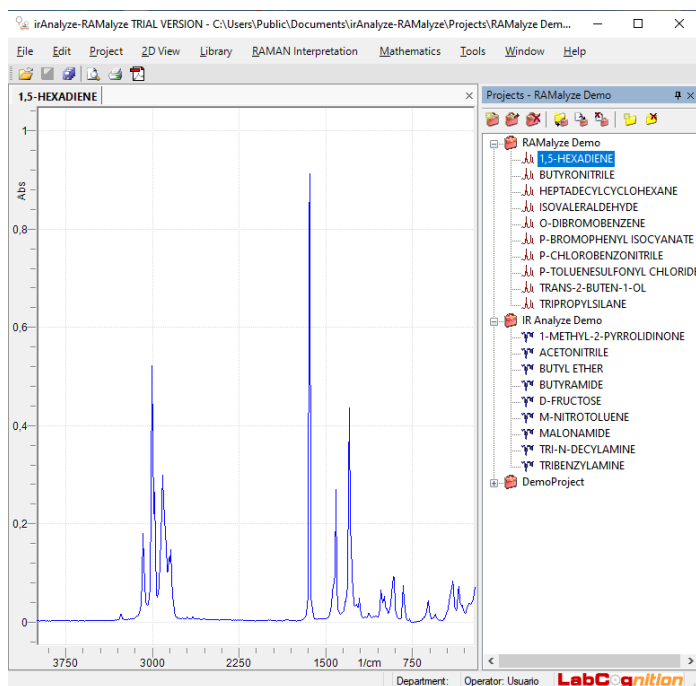
Figura 40 - Abrindo os arquivos demonstrativos.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3- Depois de ter carregado os arquivos, para observar algum espectro existente na base de dados do programa é necessário que seja aberto um espectro de demonstração, localizados no canto direito da tela do programa na janela “*Projects*” dentro das pastas de cada arquivo “*Demo*”. Na Figura 41 a seguir é demonstrado esse passo.

Figura 41 - Abrindo um espectro IR/Raman demonstração.

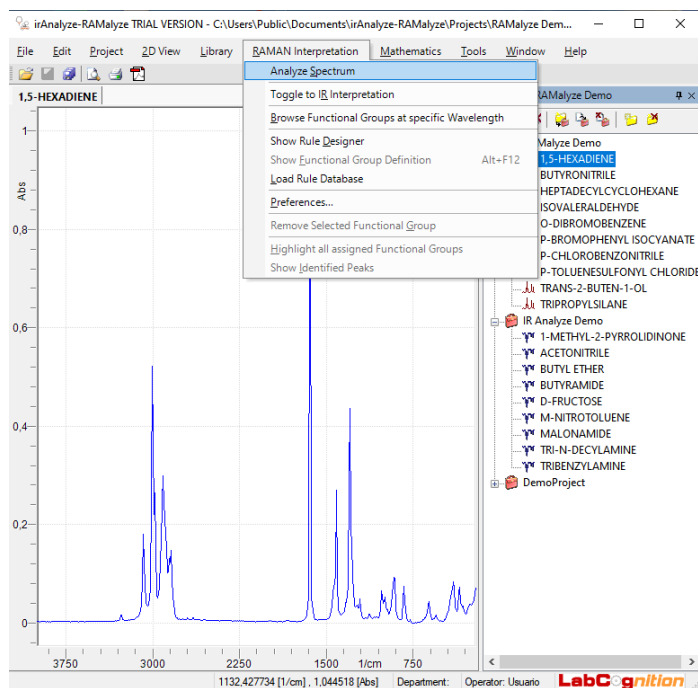


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3.3 Interpretação automática do espectro

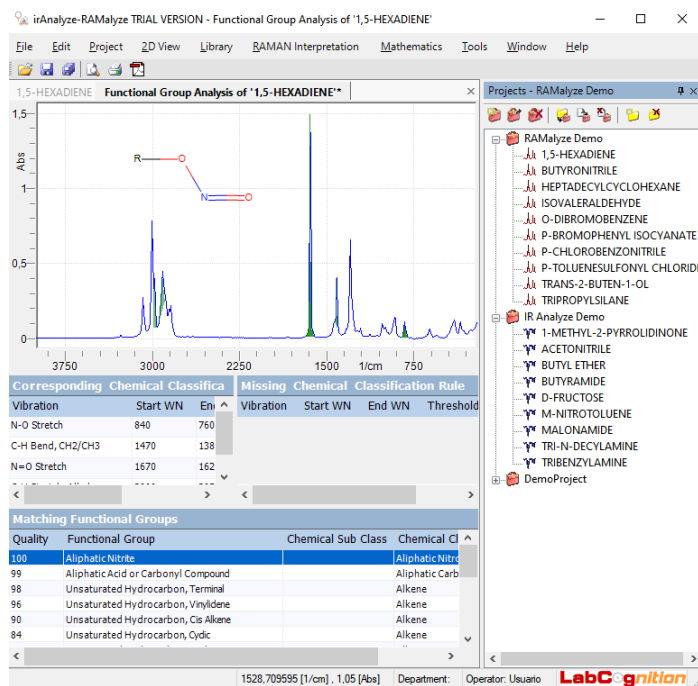
Para iniciar a interpretação automática, expanda o menu “Interpretação IV” ou “Interpretação RAMAN” e clique em “Analisar espectro”, assim o resultado da interpretação será exibido imediatamente. Clique nos nomes dos grupos funcionais na tabela inferior para atualizar a visualização. Essa etapa pode ser realizada de acordo com os passos observados nas Figuras 42 a 44, a seguir.

Figura 42 - Análise espectral automática.



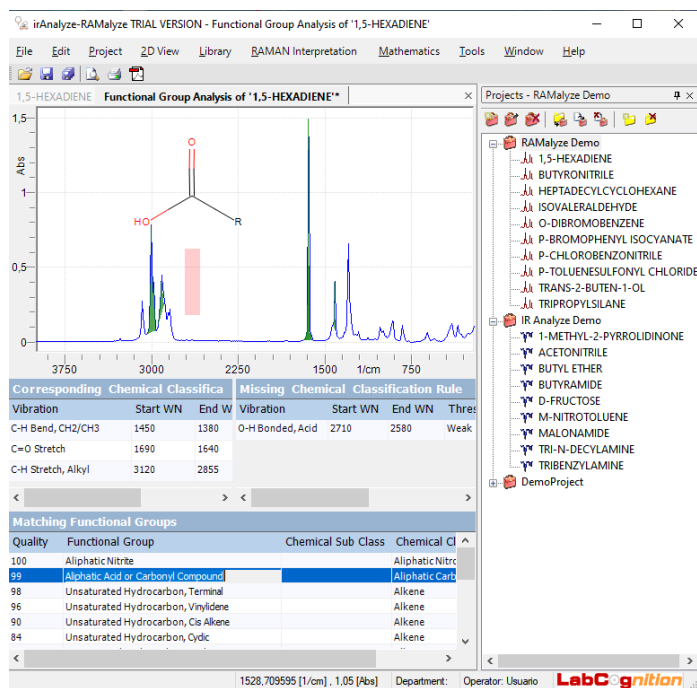
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 43 - Primeiro grupo funcional visualizado.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 44 - Segundo grupo funcional visualizado.

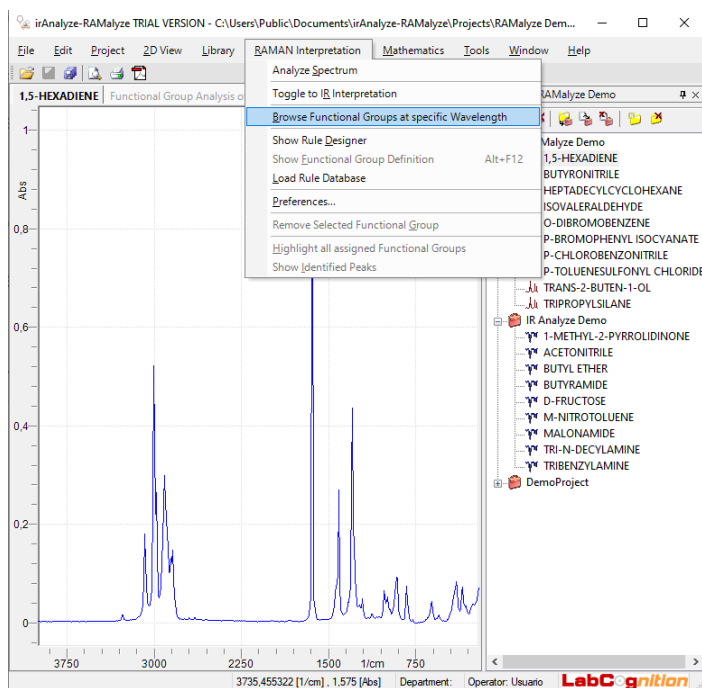


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3.4 Navegador do grupo funcional

Para iniciar o navegador do grupo funcional, expanda o menu “Interpretação IV/Interpretação Raman” e clique no comando “Navegar grupos funcionais em comprimentos de onda específicos” como é exibido na Figura 45.

Figura 45 - Navegação dos grupos funcionais.

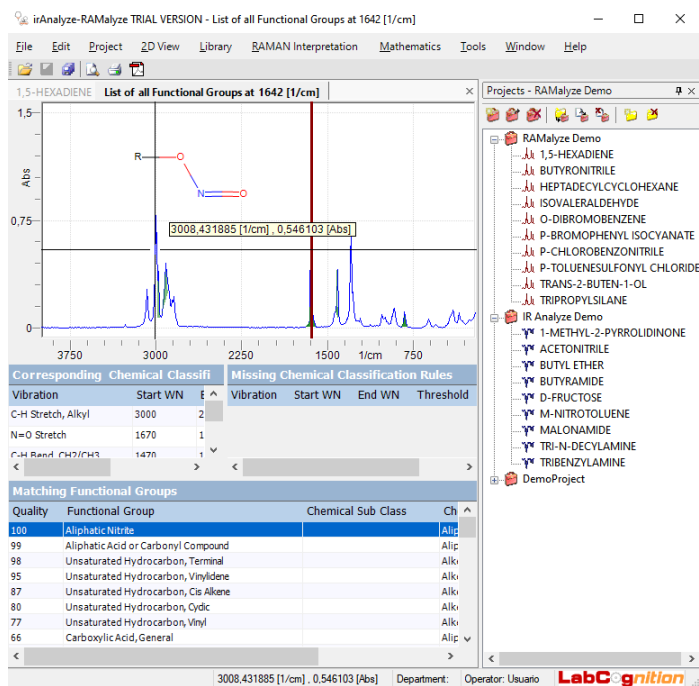


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

A linha vertical que aparece no espectro indica o comprimento de onda de interesse, é possível arrastá-la e soltar no pico de interesse do espectro. As tabelas dos grupos funcionais e dos modos de vibração são atualizadas imediatamente para exibir os grupos funcionais correspondentes naquele comprimento de onda específico.

Clique no nome de um grupo funcional para atualizar a tela, todas as vibrações relacionadas são mostradas, esse ato pode ser visualizado na Figura 46.

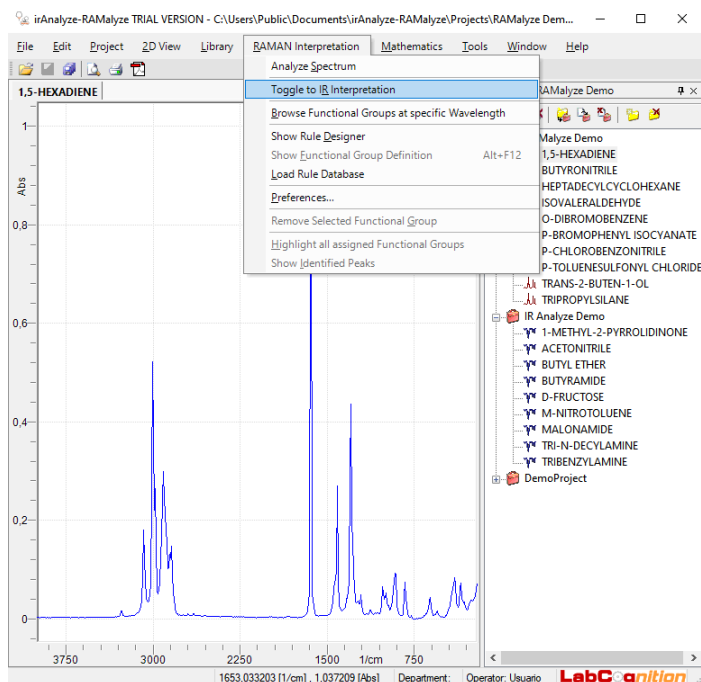
Figura 46 - Tabelas dos grupos funcionais e dos modos de vibração.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Caso o interesse seja em interpretação de IV e Raman, sem problemas: durante o período de teste, é possível alternar facilmente entre os dois modos de análise, apenas clicando no comando de menu “Alternar para Interpretação IV/Raman”, como é mostrado na Figura 47.

Figura 47 - Alternando o modo de análise espectral.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3.5 Pré-processamento de espectros

Os dados espectrais brutos devem ser submetidos a alguns tratamentos para que sejam eliminados o máximo de ruídos de fundo possível, e assim seja aprimorada a técnica de discriminação entre os diferentes grupos de amostras de acordo com suas principais características mesmo com a alta diversidade das moléculas biológicas.

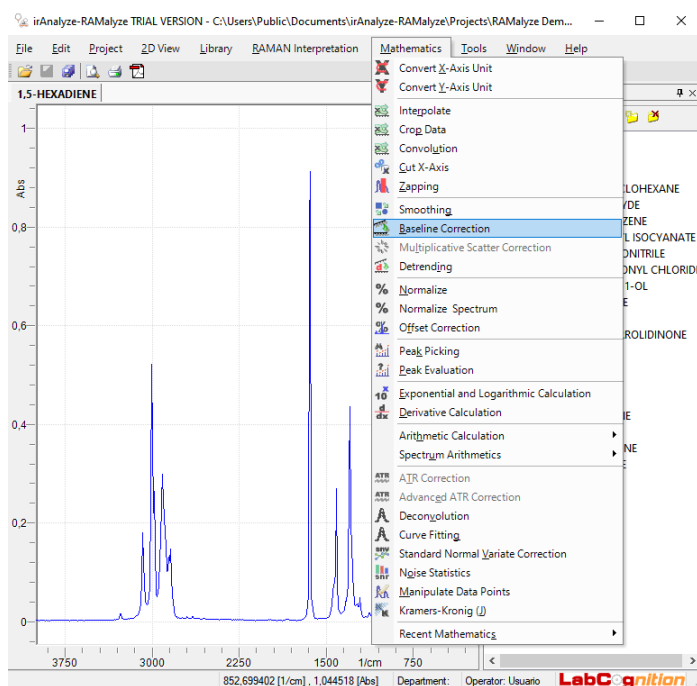
1-Correção da linha de base

Uma das adversidades comumente detectadas durante a interpretação de um espectro obtido principalmente, de amostras biológicas, é a fluorescência que muitas vezes é gerada pelas próprias moléculas biológicas e responsáveis por dificultar a análise espectral, uma vez que a fluorescência geralmente é muito maior em magnitude do que a dispersão Raman e acaba obscurecendo o sinal Raman.

A fluorescência ocorre quando o fóton incidente têm energia suficiente para excitar a molécula para um estado de energia eletrônica superior, e por isso, a molécula relaxa e diminui os níveis de energia vibracional dentro do seu estado de excitação eletrônica antes mesmo de emitir um fóton e voltar ao estado fundamental de energia.³⁶

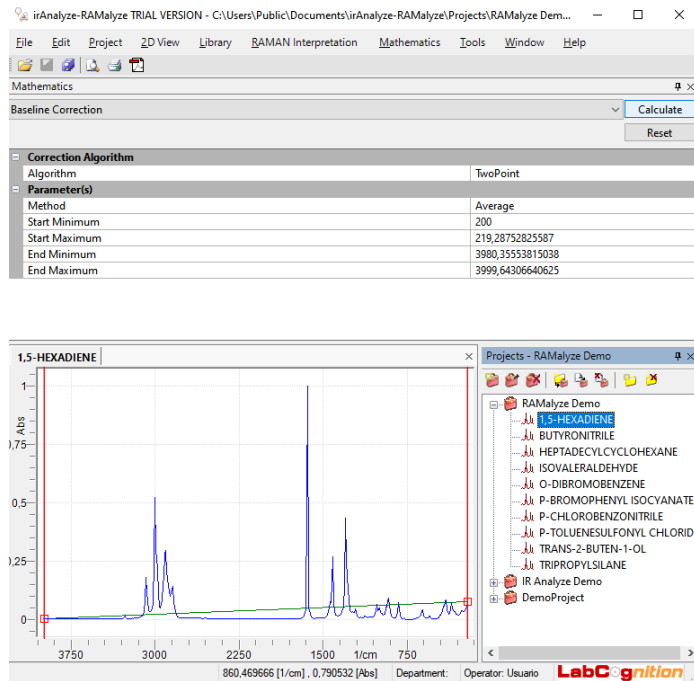
Apesar de haver diversas formas de subtrair a fluorescência do espectro bruto, nesse software têm um algoritmo automatizado que consegue realizar tal tarefa deixando apenas as bandas Raman, isso pode ser realizado a partir de poucos passos como mostrado nas Figuras 48 a 51.

Figura 48 - Corrigindo a linha de base do espectro.



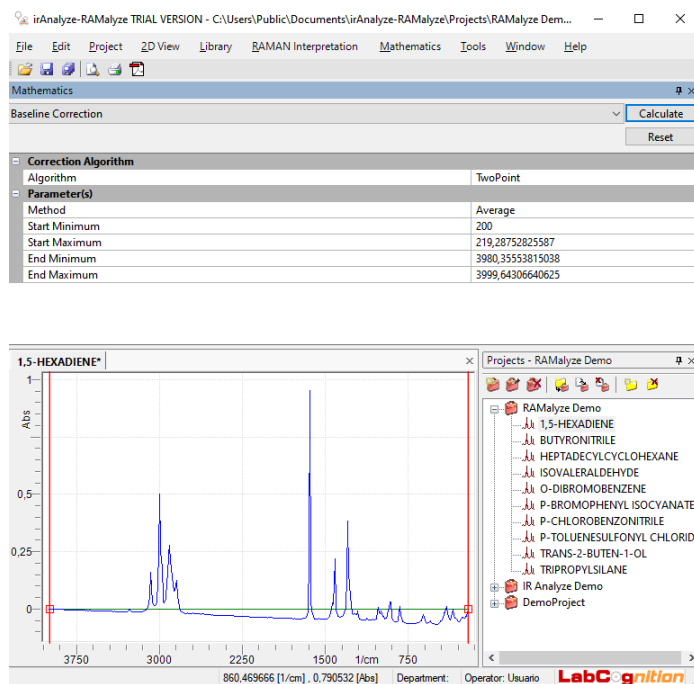
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 49 - Corrigindo a linha de base do espectro.



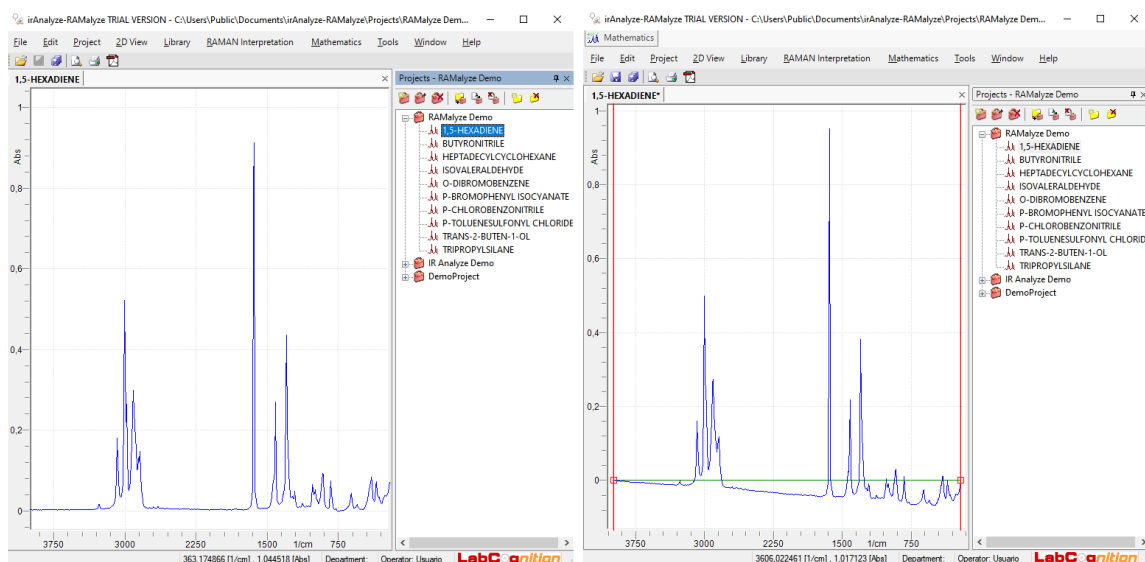
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 50 - Corrigindo a linha de base do espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 51 - Antes e depois de aplicar o recurso “Correção de linha de base”.

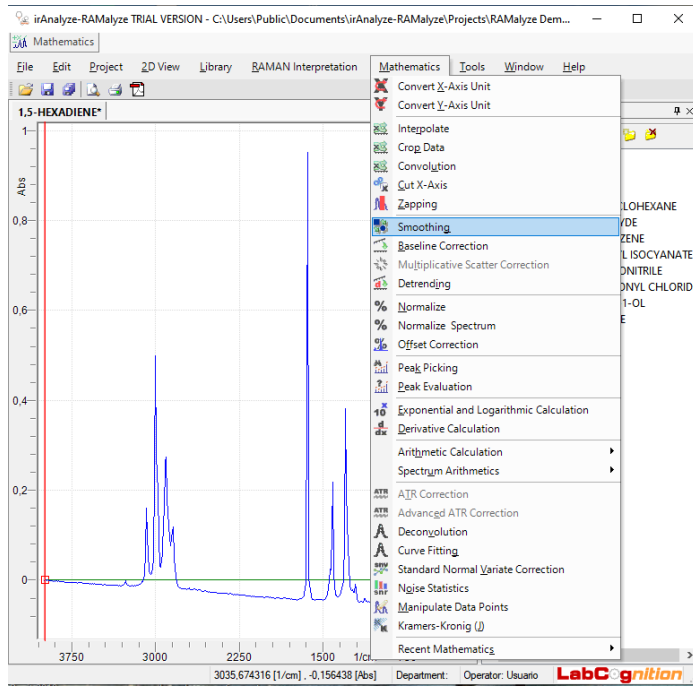


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

2-Suavização

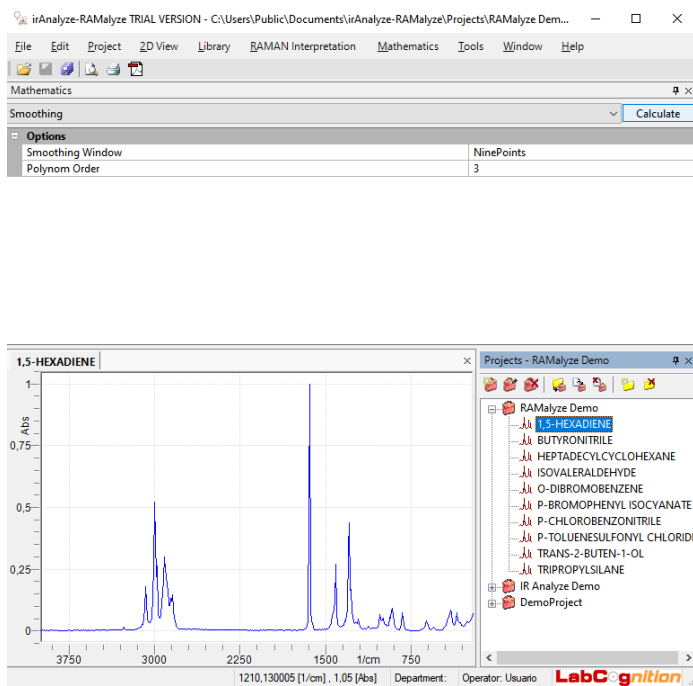
Outro impasse importante a ser resolvido na etapa do pré processamento espectral são algumas eventuais variações que acabam ficando sobrepostas no sinal, portanto há a necessidade de suavizar os dados espectrais e remover esses efeitos indesejáveis (ruídos) geralmente a forma de eliminar essas perturbações é aplicando um filtro polinomial a esses dados espectrais. O excesso de suavização pode promover perda de informações importantes, por isso deve ser realizado com moderação, esse processo pode ser realizado de acordo com os passos retratados nas Figuras 52 a 55.

Figura 52 - Suavizando o espectro.



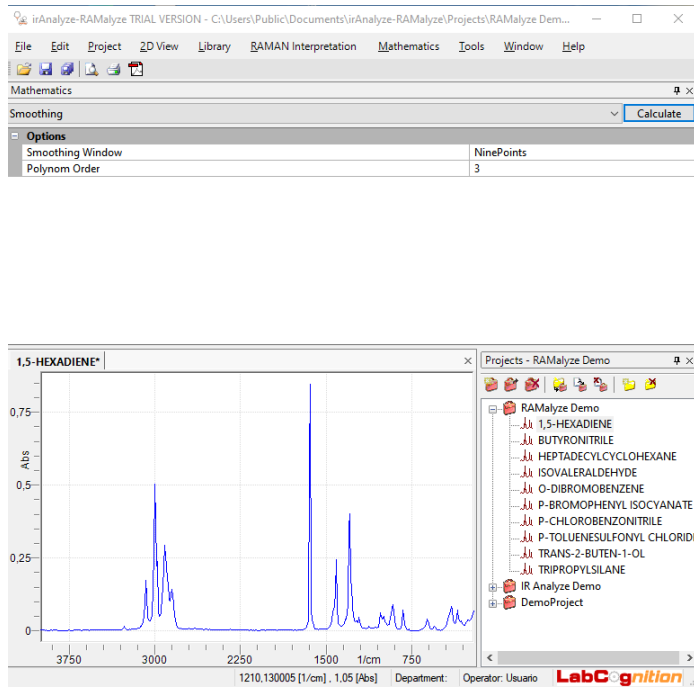
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 53 - Suavizando o espectro.



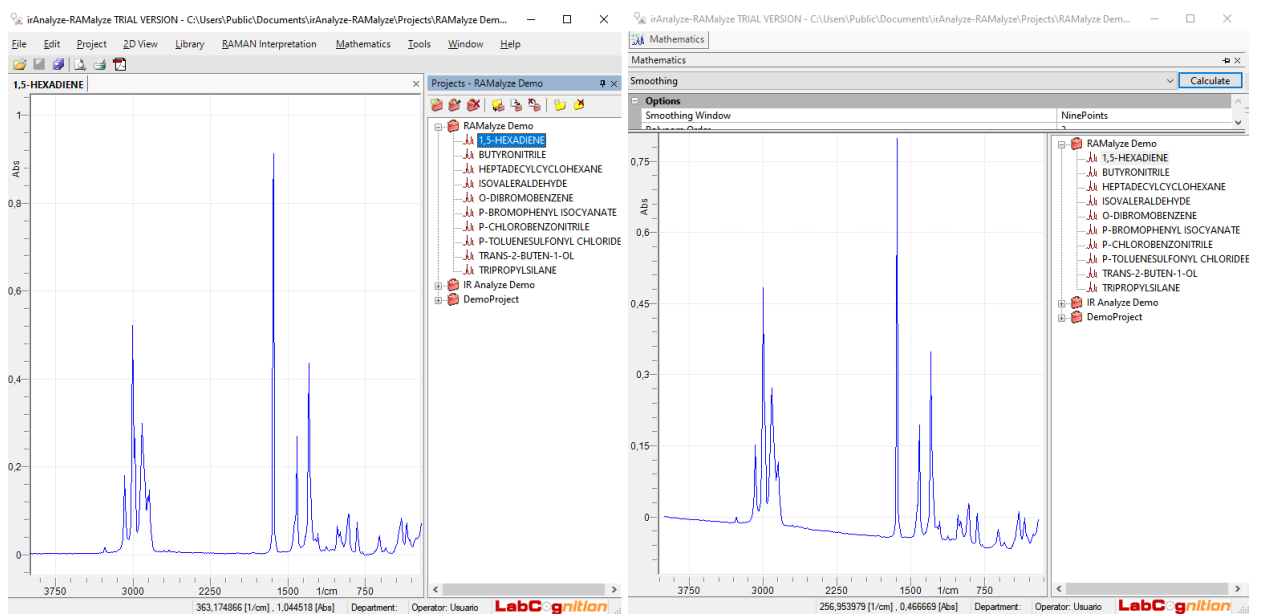
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 54 - Suavizando o espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 55 - Antes e depois de aplicar o recurso “Suavização”.

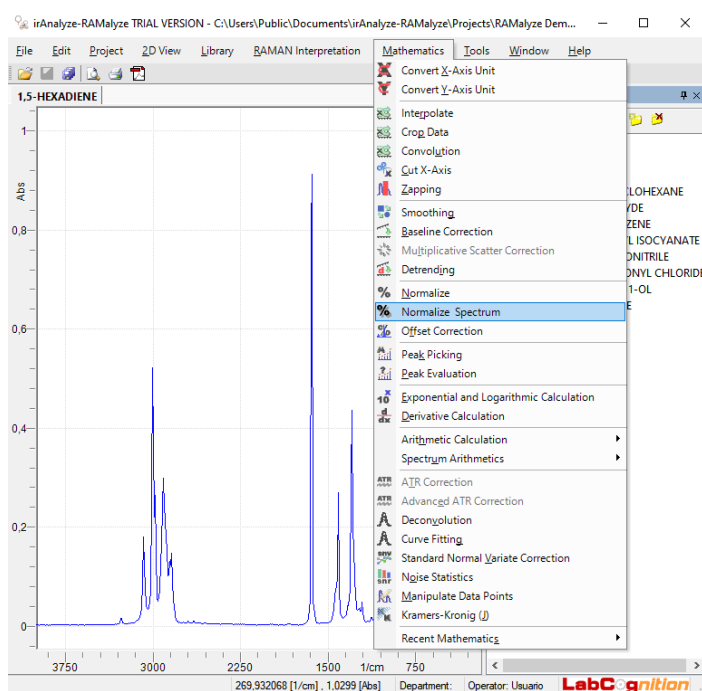


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

3-Normalização

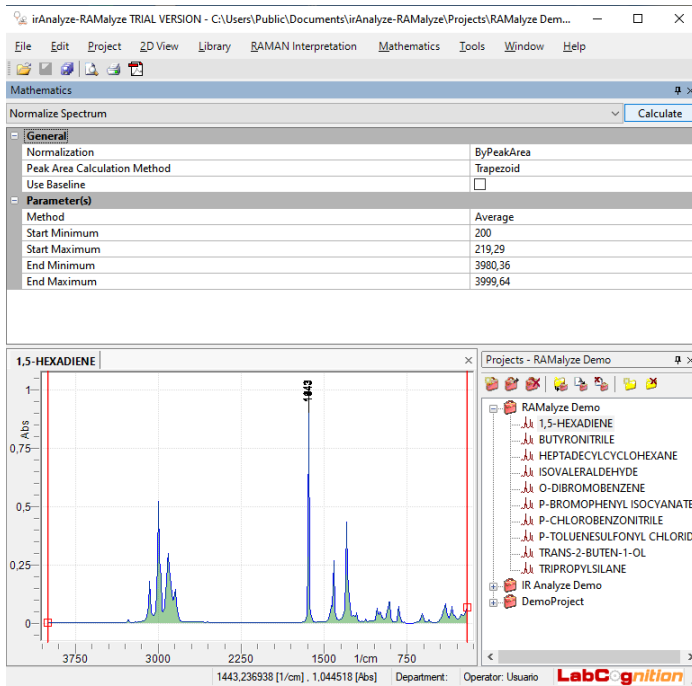
Outra estratégia pré processamento utilizada é a chamada normalização, esse recurso auxilia a identificação qualitativa de espectros que são direcionados a uma biblioteca de referência. Pode ser realizado de acordo com as etapas apontadas nas Figuras 56 a 58 abaixo.

Figura 56 - Normalizando o espectro.



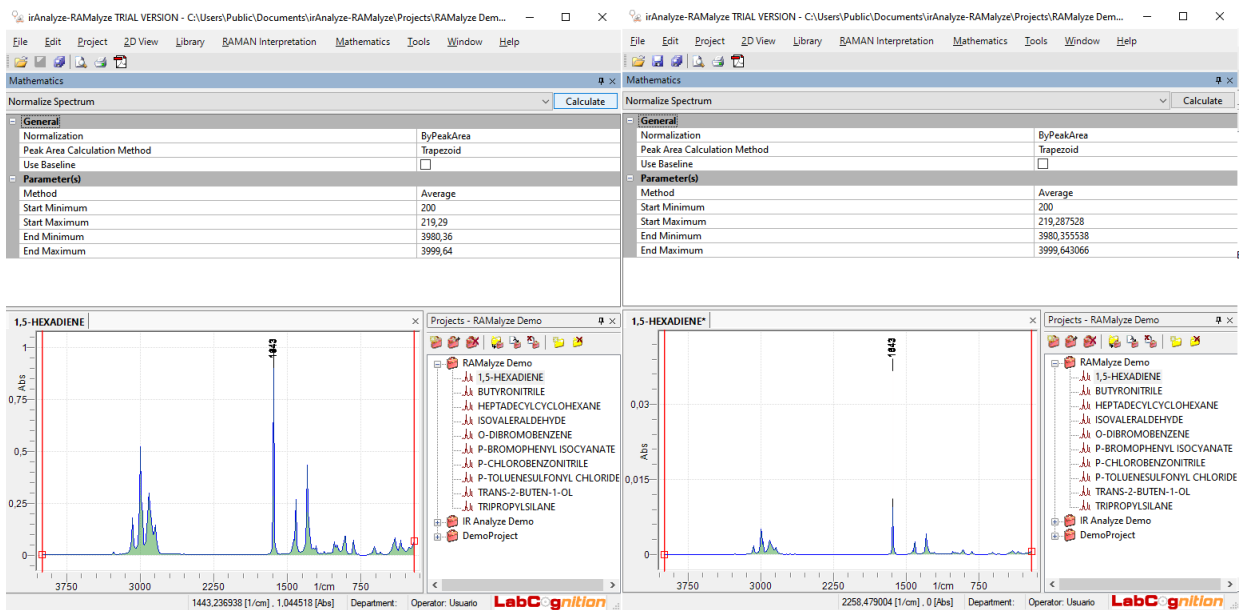
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 57 - Normalizando o espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 58 - Antes e depois de aplicar o recurso “Normalização”.

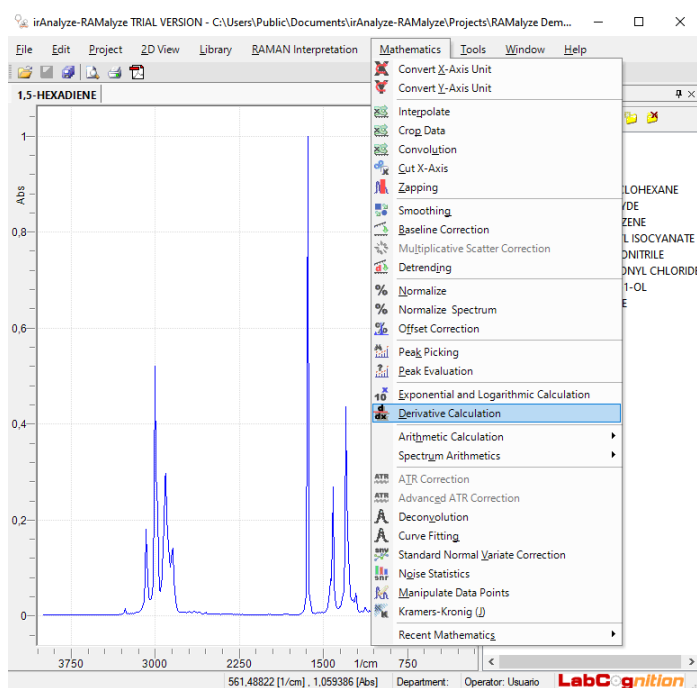


Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

4-Espectro derivado

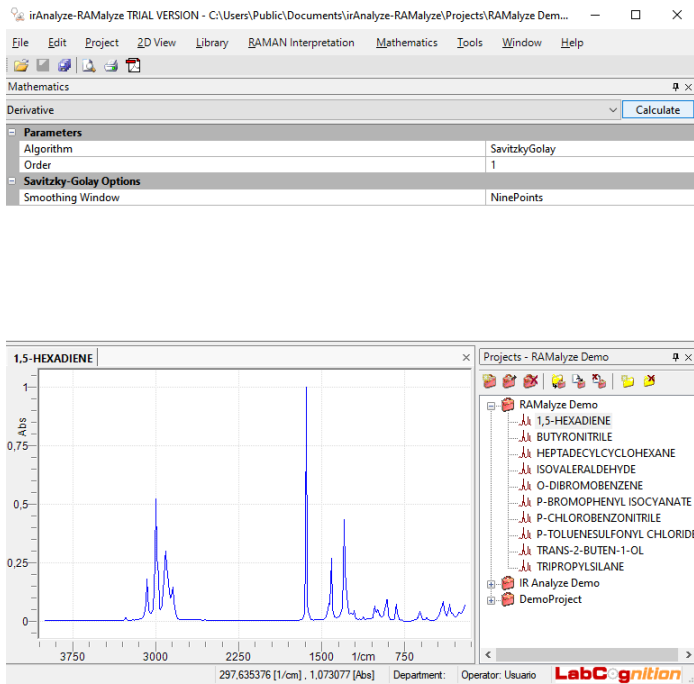
A derivação espectral é utilizada com o intuito de remover possíveis ruídos de fundo que poderiam atrapalhar a análise qualitativa e/ou a quantificação, a primeira e segunda derivada do espectro geralmente variam com maior amplitude em relação aos dados espectrais primários (originais) e são úteis para aprimorar a resolução de espectros Raman e facilitar a identificação e localização de picos e vales em um espectro com complexidade maior. Uma adversidade encontrada na técnica de derivação espectral é que a relação sinal-ruído (SNR) aumenta para derivadas de ordens superiores. Nas Figuras 59-61 é exibido os passos necessários para o cálculo da derivada do espectro.

Figura 59 - Calculando a derivada do espectro.



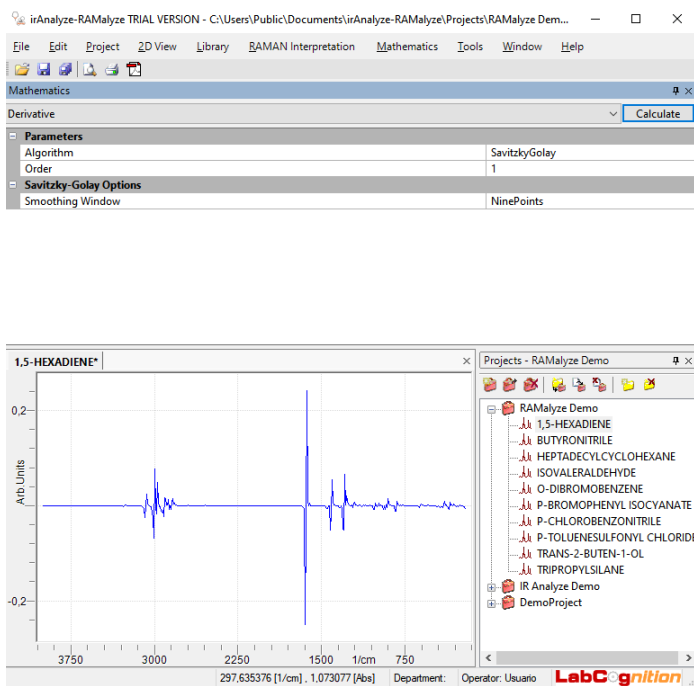
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 60 - Calculando a derivada do espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

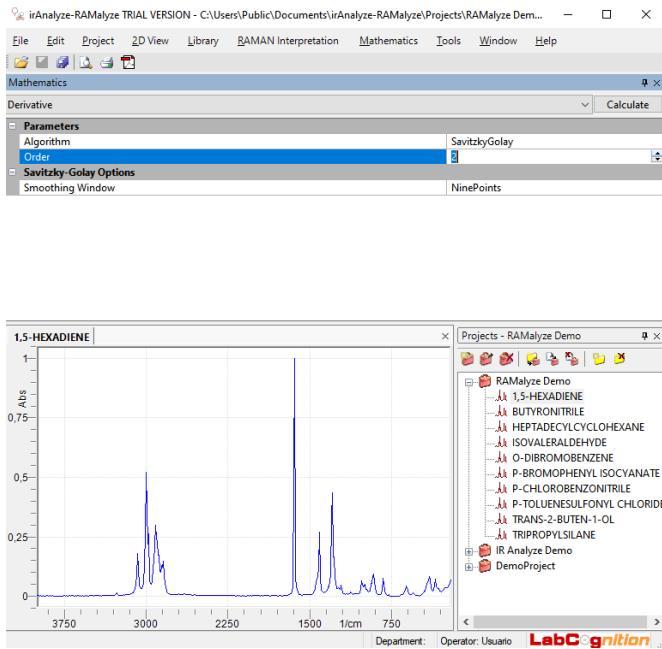
Figura 61 - Primeira derivada do espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

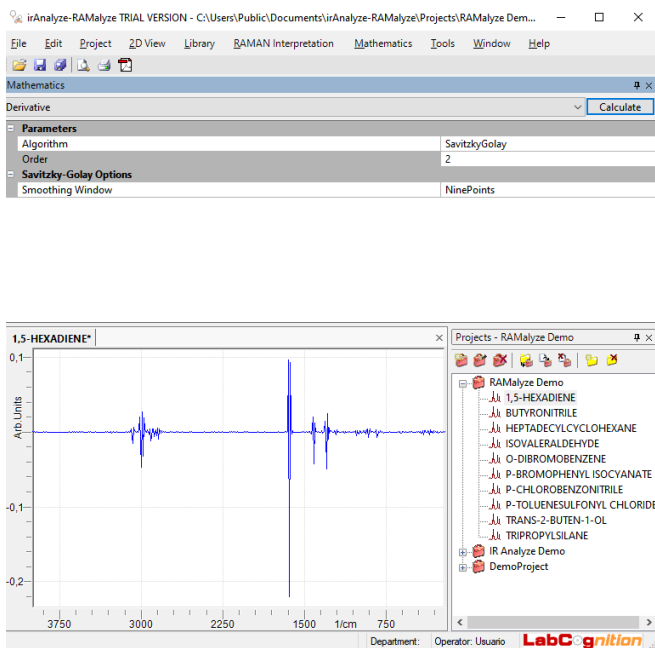
Para calcular derivadas de ordens superiores, basta alterar a ordem como é mostrado na Figura 62 abaixo.

Figura 62 - Calculando derivadas de ordens superiores do espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

Figura 63 - Segunda derivada do espectro.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa.

4 CONCLUSÃO E FUTURAS DIREÇÕES

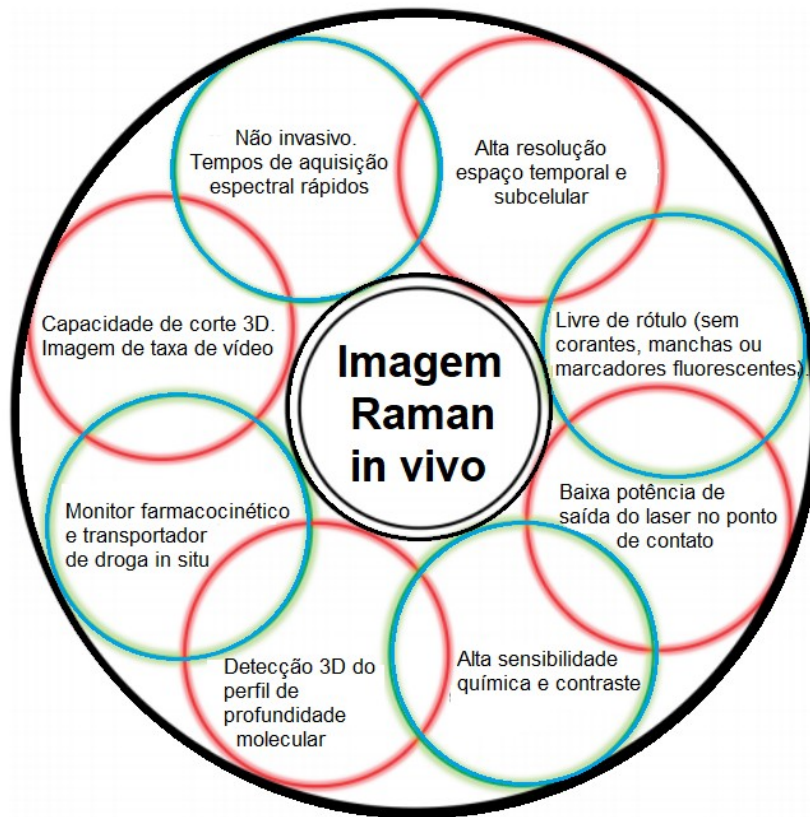
A maior parte dos estudos levantados no presente trabalho utiliza técnicas de imagem como microscopia eletrônica, aliada a espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier para auxiliar a visualização dos tecidos ósseos, tendo em vista que técnicas de imagens contribuem para a identificação dos diferentes materiais biológicos que osso é constituído.

Pode-se concluir que o avanço de técnicas de espectroscopia com abordagem no tratamento e/ou diagnóstico de disfunções ósseas devem considerar além da densidade mineral óssea, as características estruturais tanto do osso trabecular como do osso cortical.⁸ O foco das investigações espectrais consiste na identificação dos principais picos de interesse dos conteúdos orgânicos e inorgânicos dos ossos, e a diferenciação de cada característica identificada.

O futuro da técnica de espectroscopia Raman promete melhorias importantes nos aparatos que se sofisticam a cada nova implementação tecnológica e necessárias para que seja de fato utilizada na rotina clínica, fornecendo imagens com alta resolução de forma não invasiva além da aquisição rápida. Especialistas tem apontado que o Raman *in vivo* (Figura 64) pode ser uma técnica promissora para auxílio em procedimentos cirúrgicos.

Além disso, tendo em vista a contribuição das técnicas abordadas em relação a solução inclusive de problemas instaurados na área da saúde, foi elaborado um mini roteiro do programa *irAnalyze-RAMalyze* com a finalidade de contribuir aos que pretendem iniciar algum tipo de estudo envolvendo a utilização de técnicas espectroscópicas e que precisem tratar seus dados antes mesmo da análise de interesse.

Figura 64 - Aplicação de imagens Raman *in vivo*, principais características.



Fonte: Adaptada de ³⁵.

REFERÊNCIAS

- 1) MENEZES FILHO, H. de, CASTRO, L. C. G. de, & DAMIANI, D. **Hypophosphatemic Rickets and Osteomalacia**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 50, n. 4, p. 802–813, Agosto 2006. doi:10.1590/s0004-27302006000400025
- 2) UBERLÂNDIA (MG). Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Física-INFIS. Curso de Física Médica. **Projeto Pedagógico do Curso de Graduação em Física Médica**. Uberlândia: 2016.
- 3) CADDEO, S., BOFFITO, M., & SARTORI, S. **Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 5, n. 40, July 2017. doi: 10.3389 / fbioe.2017.00040
- 4) OP-TEC The National Center for Optics and Photonics Education. **Basics of Spectroscopy**. University of Central Florida, 2008.
- 5) JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013.
- 6) BUCKWALTER, J. A.. et al.. **Bone Biology**. Instructional Course Lectures. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Rosemont, Illinois, v. 45, March 1996.
- 7) **X-Ray Mass Attenuation Coefficients**. NIST. (n.d.). Disponível em: <<https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab2.html>>. Acesso em: 28/06/21.
- 8) OSTERHOFF, G. et al. **Bone Mechanical Properties and Changes with Osteoporosis**. Injury, June 2016. doi:10.1016/S0020-1383(16)47003-8
- 9) GALANTE, J., ROSTOKER, W., & RAY, R. D. **Physical Properties of Trabecular Bone**. Calcified Tissue Research, v. 5, n. 1, p. 236–246, 1970. <https://doi.org/10.1007/BF02017552>
- 10) de OLIVEIRA, R. C. G. et al. **Assessments of Trabecular Bone Density at Implant Sites on CT Images**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, v. 105, n. 2, p. 231–238, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.08.007>

- 11) HART, N. H. et al. **Mechanical Basis of the Bone Strength: Influence of Bone Material, Bone Structure and Muscle Action**. Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions (Austrália), p. 114-139, 2017.
- 12) SHAH, F. A., RUSCSÁK, K., & PALMQUIST, A. **50 Years of Scanning Electron Microscopy of Bone—a Comprehensive Overview of the Important Discoveries Made and Insights Gained Into Bone Material Properties in Health, Disease, and Taphonomy**. Bone Research, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0053-z>
- 13) JUDAS, F., PALMA, P., & FIGUEIREDO, H. **Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo**. p.1–51, 2012.
- 14) AFSARIMANESH, N., ALAHI, M., MUKHOPADHYAY, S., & KRUGER, M. **Smart Sensing System for Early Detection of Bone Loss: Current Status and Future Possibilities**. Journal of Sensor and Actuator Networks, v. 7, n. 1, 2018. doi:10.3390/jsan7010010
- 15) BOSKEY, L. A.; **Mineralization of Bones and Teeth**, ELEMENTS , v. 3, p . 387–393, Dec. 2007.
- 16) BRASIL. Agência Nacional de Osteogênese Imperfeita-ANOI. Disponível em: http://www.anoi.com.br/p/osteogeneses-imperfeita_14.html>. Acesso em: 30/06/21.
- 17) BRASIL. Associação Brasileira de Osteogenesis Imperfecta-ABOI. Disponível em: http://www.senado.gov.br/comissoes/CE/AP/AP20130424_KatiaOgawa.pdf>. Acesso em: 30/06/21.
- 18) FRATZL-ZELMAN, N., et al. **Mineral Particle Size in Children with Osteogenesis Imperfecta Type I is not Increased Independently of Specific Collagen Mutations**. Bone, 60, p. 122–128, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.11.023>
- 19) Nelson, K., Connor, M., Wensley, C., Moss, C., Pack, M., & Hussey, T. (2011). **Bone Density Testing in Clinical Practice**. Emergency Medicine Australasia : EMA, 23, 532–540. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995467>
- 20) ALVARENGA, M. P. P. **Escore do Osso Trabecular como Método na Avaliação da Qualidade Óssea em Mulheres com Baixa Estatura**. 2019. p.1-54, Dissertação de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Universidade Federal de Minas Gerais UFMG. Belo Horizonte, 2019.
- 21) CHO, N., & SHOKEEN, M. **Changing landscape of optical imaging in skeletal metastases**. Journal of Bone Oncology, 17, 2019. doi:10.1016/j.jbo.2019.100249

- 22) MUNDY, G. R.: **Mechanisms of Bone Metastasis**. Cancer Supplement. v. 80, n. 8, p. 1546-1556, October 1997.
- 23) MUNDY, G. R. **Metastasis to Bone: Causes, Consequences and Therapeutic Opportunities**. Nature Reviews Cancer, v.2, n. 8, p. 584–593, 2002. doi:10.1038/nrc867
- 24) DAVID, L., & SALLE, B.: **Raquitismo**, EMC - Pediatria, v. 42 , n. 4, p.1-25, 2007. doi: 10.1016 / s1245-1789 (07) 70236-6
- 25) CHARLES, F. J. **Paget Disease of Bone**. Manual Consumer Version MSD. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-%C3%B3sseos,-articulares-e-musculares/doen%C3%A7a-de-paget-do-osso/doen%C3%A7a-de-paget-do-osso>>. Acesso em: 29/06/21.
- 26) GARANT, P. R. **Oral Cells and Tissues**: New Malden, Surrey: Quintessence Publishing Co. LTD, p. 430, 2003.
- 27) MANDAIR, G. S., & MORRIS, M. D. **Contributions of Raman Spectroscopy to the Understanding of Bone Strength**. Bonekey Reports, v. 4, p. 620, 2015. doi:10.1038/bonekey.2014.115
- 28) Techniques, B., & Page, M. (n.d.). **Module 2 Spectroscopic Techniques**: Lecture 3 Basics of Spectroscopy. NPTEL-Biotechnology-Bioanalytical Techniques and Bioinformatics. p. 1–99.
- 29) STRINGASCI, M. D. **Distribuição de Luz em Meios Túrbidos**. Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<https://www.ifsc.usp.br/~strontium/Teaching/Material2011-2%20SFI5877%20Luzmaterial/Seminario%20-%20Mirian%20-%20Distribuicao%20de%20luz%20em%20meios%20turbidos.pdf>>
- 30) ANDRADE, B. S. E. **Sistema de Espectroscopia Funcional em Infravermelho Próximo (fNIRS) para Aplicação em Interface Cérebro-Computador (BCI)**. 2019. p. 1-167, Tese de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2019.
- 31) MITSUTAKE, H., POPPI, R. J., & BREITKREITZ, M. C. **Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique**, v. 30, n.11, p. 2243–2258, 2019.

- 32) FLANAGAN, C. D. et al. **Raman Spectral Markers of Collagen Denaturation and Hydration in Human Cortical Bone Tissue are Affected by Radiation Sterilization and High Cycle Fatigue Damage**. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 75, p. 314–321, November 2017.
- 33) PANSARE, K. & KRISHNA, M.C. **Raman Theranostics - An Overview of Raman Applications in Therapeutic Monitoring**. *Asian Journal of Physics*, v. 29, n. 3 & 4, p. 261-272, July 2020.
- 34) YANG, F. et al. **Conservation of bone relics using hydroxyapatite as protective material**. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, v. 122, n. 4, p. 1–5, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00339-016-0015-x>
- 35) ELLIS, D. I., COWCHER, D. P., ASHTON, L., O'HAGAN, S., & GOODACRE, R. **Illuminating Disease and Enlightening Biomedicine: Raman Spectroscopy as a Diagnostic Tool**. *Analyst*, v. 138, n. 14, p. 3871–3884, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3an00698k>
- 36) SMITH, G. P. S. et al. **Raman Imaging of Drug Delivery Systems** ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 89, p. 21–41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.005>
- 37) AGILENT TECHNOLOGIES. **Princípios da Espectroscopia Molecular** : Hardware Desenvolvendo. Academic & Institutional Research, 2016.
- 38) PIANTAVINI, M. S. **Desenvolvimento e Validação de Modelos Multivariados Usando PLS para Quantificação de Febantel , Pamoato de Pirantel e Praziquantel Utilizando UV e IV**. 2014, p. 1-118, Tese ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná-Doutor em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, 2014.
- 39) **Infrared Spectroscopy**. (n.d.). Disponível em:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy>. Acesso em: 27/06/2021.
- 40) CONSTANTINO, M. G. **Espectroscopia no Infravermelho**. *Química Orgânica, Curso Básico Universitário*, v. 3, p. 95–137, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600018>
- 41) CRAWFORD-MANNING, F. et al. **Multiphoton Imaging and Raman Spectroscopy of the Bovine Vertebral Endplate**. *The Analyst*, v. 146, n. 13, p. 4242–4253, 2021.
<https://doi.org/10.1039/d1an00702e>

- 42) AGUERGARAY, C. et al. **Raman Spectroscopy Reveals Age- and Sex-Related Differences in Cortical Bone from People with Osteoarthritis**. Scientific Reports, v.10, n. 1, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76337-2>
- 43) SHAH, F. A. **Characterization of Synthetic Hydroxyapatite Fibers Using High-Resolution, Polarized Raman Spectroscopy**. Applied Spectroscopy, v. 75, n. 4, p. 475–479, 2021. <https://doi.org/10.1177/0003702820942540>
- 44) MANDAIR, G. S. et al. **Altered Collagen Chemical Compositional Structure in Osteopenic Women With Fractures: A Case-Control Raman Spectroscopy Study**. Bone, 148, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2021.115962>
- 45) UNAL, M. **Raman spectroscopic determination of bone matrix quantity and quality augments prediction of human cortical bone mechanical properties**. Journal of Biomechanics, 119, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2021.110342>
- 46) ANASTASSOPOULOU, J. et al. **An FT-IR Spectroscopic Study of Metastatic Cancerous Bones**. p. 89-100, 2015. <https://dx.doi.org/10.5772/58910>