

DETERMINATION AND OPTIMIZATION OF ATR-FTIR PARAMETERS FOR BONE TISSUE ANALYSIS

Carolina Benetti¹, Moisés Oliveira dos Santos¹, Thiago Martini Pereira¹, Denise Maria Zezell¹
¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN – CNEN/SP; Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo, SP, Brasil CEP 05508-900
E-mail: carolina.benetti@gmail.com

RESUMO

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sido extensivamente utilizada na análise de materiais biológicos. Usualmente, os espectrômetros permitem a de matérias em diferentes estados, por isso uma série de parâmetros devem ser definidos para otimizar o espectro da amostra que se deseja analisar. Neste trabalho, foram determinadas as melhores condições do equipamento para a obtenção do espectro de tecido ósseo. A técnica espectroscópica utilizada foi a da reflexão total atenuada, que possibilita a obtenção de espectros qualitativos de amostras sólidas independente de sua espessura. As amostras foram obtidas da tíbia de coelhos New Zealand. Os parâmetros estudados foram: a resolução do equipamento, que determina o passo da medida em número de onda; o número de varreduras, e a velocidade de movimentação do espelho do interferômetro. Os parâmetros foram determinados de forma a obter uma boa qualidade de sinal, melhor relação sinal ruído e menor tempo de coleta.

Descritores: ATR-FTIR, osso, qualidade de sinal.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) vem sendo extensivamente utilizada na análise de materiais orgânicos [1] devido a novos acessórios desenvolvidos para acoplamento nos espectrômetros que

ABSTRACT

The technique of Fourier Transform Infrared (FTIR) has been extensively used in the analysis of biological material. Usually, the spectrometers allow the characterization of different types of materials, in different physical states, however some parameters of equipment must be set to optimize the spectrum obtained. This study determined the best conditions of the spectrometer to obtain the spectrum of bone samples. The FTIR techniques used was the attenuated total reflection (ATR) which permits to obtain spectra of solid samples regardless of their thickness. The samples were obtained from the tibia of New Zealand rabbit. The parameters studied were: the resolution of the equipment, which determines how close two peaks will be one of the other; the number of scans; and speed of movement of the mirror of the interferometer. The parameters were determined to the final spectrum have a good signal quality, better signal-noise rate, and a shorter time of data acquisition.

Keywords: ATR-FTIR, bone, signal quality.

permitem obtenção de maior resolução e análise espectral espacial. Essa técnica permite identificar os componentes da amostra analisada, possibilitando uma análise semiquantitativa, além de fornecer informações químicas e estruturais do material [2] [3]. Entretanto, para obter as informações desejadas sobre o material

analisado é necessário obter um espectro com boa qualidade, que permita a identificação das bandas e com o menor ruído possível.

Alguns dos parâmetros do equipamento espectrômetro, como resolução, número de varreduras e velocidade do espelho movel, estão diretamente relacionados a qualidade de sinal. Podendo ser alterados conforme o tipo de amostra e a precisão e qualidade desejada.

Resolução: A resolução do equipamento determina quão próximos dois picos podem estar entre si e ainda assim serem identificados como dois picos independentes. Quanto menor o valor da resolução, melhor definida é a posição dos picos. É recomendado aumentar a resolução o suficiente para diferenciar os picos de interesse, uma vez que aumentar a resolução mais que o necessário não promove nenhuma informação adicional e pode aumentar o ruído do espectro, além de aumentar o seu tempo de coleta.

Número de Varreduras: O número de varreduras, como o próprio nome diz, determina quantas varreduras serão realizadas durante a aquisição do *background* (espectro do ambiente descontado do espectro obtido) e do espectro da amostra. Quando mais de uma varredura é realizada, o sistema calcula a média para o espectro final. Normalmente, aumentando-se o número de varreduras diminui-se o ruído, entretanto aumenta-se o tempo de aquisição de dados.

Velocidade: O parâmetro velocidade determina a velocidade de movimentação do espelho do interferômetro. O valor da velocidade é definido pelo tipo de detector, pelas informações que se deseja obter e pelo tipo de amostra. Uma alta velocidade consegue-se realizar um número de varreduras maior em menos tempo, entretanto isso pode aumentar o ruído do espectro.

Uma forma de quantificar a qualidade do espectro é calculando-se a razão entre a intensidade do sinal e o ruído de um espectro. Quanto maior o valor desta razão, melhor a qualidade do espectro.

A intensidade do sinal é representada pela distância pico a pico, que é a diferença do valor máximo e mínimo de absorbância registrado. Quanto maior o seu valor, mais bem definidos os picos.

O ruído é representado pelo RMS (root mean square) [4]. O RMS é calculado utilizando-se a expressão (1) :

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}{n}} \quad (1)$$

onde S_x é o valor esperado para o espectro, S_i é o valor efetivo do sinal na i -ésima medida, e n é o total de medidas realizadas. Ele representa a variação do sinal em relação ao ajuste esperado, podendo ser comparado ao desvio padrão. Quanto maior o seu valor mais ruidoso o espectro.

A região espectral normalmente utilizada para o cálculo do RMS é entre 2050-1950 cm^{-1} , devido à ausência de bandas nesta região, para amostras de tecido ósseo.

O objetivo deste trabalho foi determinar os melhores parâmetros a serem utilizados no equipamento ATR-FTIR para a análise de tecido ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS DE ANÁLISE

As amostras foram obtidas da tíbia de um coelho adulto, macho, da raça New Zealand, adquirido do Biotério da Faculdade de Medicina da USP. Após o sacrifício utilizando quetamina e xilazina em dose letais, os ossos foram seccionados ao meio, a medula óssea retirada, e as partes cortadas em pedaços de aproximadamente 10 X 15 mm, utilizando-se o motor odontológico de alta rotação com uma ponta diamantada (endo Z – 21mm). As amostras foram planificadas até atingir a espessura de aproximadamente 100 μm .

Foi utilizado um acessório de Reflexão Total Atenuada - ATR (*Smart Orbit, Thermo, EUA*) acoplado a um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR (*Nicolet 6700, Thermo Inc., EUA*).

O ATR utilizado tem como elemento de reflexão interna um cristal de diamante com 2,40 de índice de refração, sendo 38,8° o menor ângulo permitido para a incidência do feixe, e trabalha em ambiente de temperatura e umidade controladas em 17 °C e 40%, respectivamente, para evitar que estes fatores influenciem na obtenção dos espectros.

Utilizou-se a combinação *beamsplitter* XT-KBr e detector DTGS-TEC, indicada como a melhor para a análise na faixa espectral de interesse (4500 - 525 cm^{-1}). Os parâmetros estudados foram: a resolução do equipamento; o número de varreduras, e a velocidade de movimentação do espelho do interferômetro.

O software utilizado na aquisição dos espectros foi o software OMNIC (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). Os espectros foram salvos em formato CSV e analisados no software Origin 8.0 (Origin®, Northampton, MA, USA).

Para determinar a melhor resolução para amostras de tecido mineralizados com aproximadamente 100 μm de espessura, foram realizadas seis medidas independentes de uma mesma amostra de osso de tíbia, sendo os espectros obtidos variando-se a resolução e mantendo-se os demais parâmetros constantes, a saber: 80 varreduras e velocidade do espelho de 0,6329 cm/s . As resoluções testadas foram: 8 cm^{-1} , 6 cm^{-1} , 4 cm^{-1} , e 2 cm^{-1} . Para que a posição analisada da amostra não afetasse o espectro, os valores de resolução foram comparados dois a dois, pois o equipamento permite retirar o *background* antes e depois do espectro da amostra. Desta forma, no primeiro valor de resolução estudado, o *background* foi obtido antes do espectro da amostra, e no segundo valor, o *background* foi obtido depois. Assim os dois espectros foram obtidos sem a amostra ser movida, garantindo a análise da mesma região para os dois valores de resolução.

Na determinação do número de varreduras foram realizadas seis medidas de uma mesma amostra variando-se o número de varreduras em 120, 80, 40, 20; e mantendo-se os demais parâmetros constantes, a saber: resolução 4 cm^{-1} e velocidade do espelho de 0,6329 cm/s . Novamente, uma mesma região da amostra foi analisada com diferentes números de varreduras. Para cada espectro obtido foi calculado individualmente o RMS, e a distância pico a pico utilizando-se o software de aquisição dos espectros OMNIC.

Para verificar se é possível aumentar a velocidade de movimentação do espelho, coletamos de uma mesma região da amostra dois espectros: um com a velocidade usual de

0,6329 cm/s , e outro com uma velocidade mais rápida, de 0,9393 cm/s . Este valor foi selecionado por ser o primeiro valor de velocidade maior que 0,6329 cm/s que o programa de aquisição dos espectros permite selecionar. Os demais parâmetros do equipamento permaneceram constantes em uma resolução de 4 cm^{-1} e 40 varreduras. Como realizado na determinação do número de varreduras, calculou-se o valor da razão sinal ruído e determinou-se assim o espectro com melhor qualidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros obtidos de uma mesma região com as resoluções de 8 cm^{-1} e 6 cm^{-1} é apresentado na Figura 1.

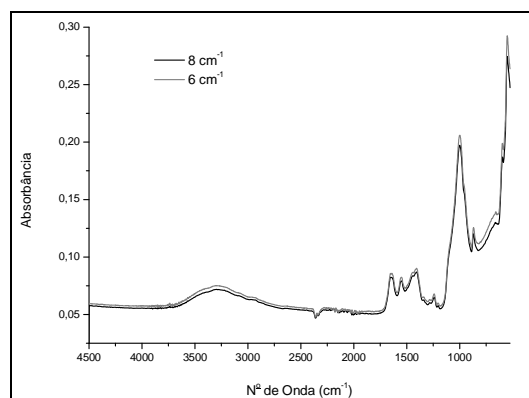


Figura 1: Espectros obtidos com resolução de 8 cm^{-1} e 6 cm^{-1} para uma mesma região da amostra não irradiada.

Para facilitar a comparação entre os espectros, na Figura 2 é apresentada a região espectral de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} dos espectros da Figura 1. O mesmo foi feito para comparar as resoluções de 6 cm^{-1} , 4 cm^{-1} e 2 cm^{-1} (Figura 3 e Figura 4).

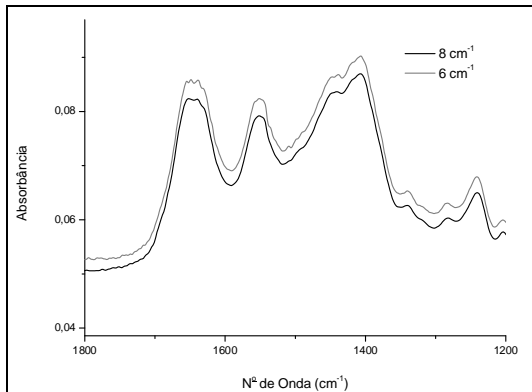


Figura 2: Região espectral de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} dos espectros obtidos com resolução de 8 cm^{-1} e 6 cm^{-1} para uma mesma região da amostra não irradiada.

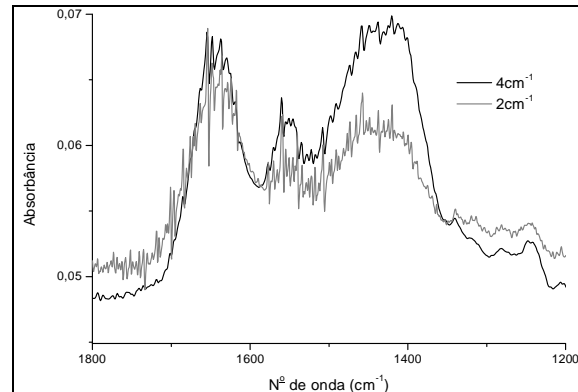


Figura 4: Região espectral de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} dos espectros obtidos com resolução de 4 cm^{-1} e 2 cm^{-1} para uma mesma região da amostra não irradiada da Figura 1 e Figura 2.

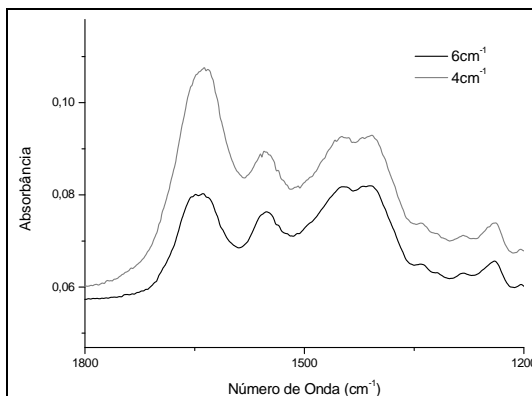


Figura 3: Região espectral de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} dos espectros obtidos com resolução de 6 cm^{-1} e 4 cm^{-1} para uma mesma região da amostra não irradiada da Figura 1.

Verificou-se na Figura 2 e Figura 3, que entre as resoluções de 8 cm^{-1} , 6 cm^{-1} e 4 cm^{-1} não há diferenças expressivas entre os espectros, portanto a melhor resolução foi a de 4 cm^{-1} , por ser a mais precisa, dentre as que apresentaram espectros com boa qualidade de sinal.

A Figura 4 mostra um espectro obtido com resolução de 2 cm^{-1} , que apesar de mais precisa, faz com que o espectro obtido seja ruidoso quando comparado com o espectro obtido com uma resolução de 4 cm^{-1} . O ruído no espectro prejudica a análise, pois dificulta determinar a posição das bandas, oculta bandas de baixa intensidade, além de aumentar a imprecisão das áreas sob as bandas. Portanto, a resolução de 2 cm^{-1} não é adequada para as amostras de analisadas neste experimento.

Na determinação do melhor número de varreduras, calculou-se os valores de RMS, distância pico a pico assim como a razão entre eles para os espectros das amostras, esta última apresentada na Tabela 1. Os diferentes tons de cinza das linhas da tabela representam diferentes regiões analisadas em uma mesma amostra, sendo que em **negrito** é destacado o resultado de melhor relação sinal/ruído para cada região.

Tabela 1: Razão entre o RMS e a distância pico a pico para cada espectro, obtidos com diferentes números de varreduras.

Número de varreduras	Razão
40	4,59
80	4,69
80	4,61
120	4,64
40	5,10
20	4,30

Conforme o esperado, quando observamos os espectros correspondentes a uma mesma região, o obtido com maior número de varreduras sempre apresentou melhor qualidade, ou seja, maior valor da razão da distância pico a pico pelo RMS. Entretanto essa diferença é mais notória quando comparamos a qualidade do espectro obtido com 20 e 40 varreduras, visto que a diferença entre as razões obtidas é de quase 16%. Nos demais casos a diferenças entre as razões não foram superiores a 3%, sendo de 2,3% quando comparamos o espectro obtido com 40 e 80 varreduras, e menor que 1% quando foram realizadas 80 e 120 varreduras. Portanto, para amostras de osso, 40 varreduras são o suficiente para obter um espectro com boa qualidade, não sendo necessário aumentar o número de varreduras e conseqüentemente o tempo de aquisição.

Os valores de RMS, distância pico a pico e sua razão obtidos para os espectros obtidos com a velocidade do espelho ajusta em 0,6329 cm/s e 0,9494 cm/s são apresentados na Tabela 2. Em negrito é enfatizado o resultado de melhor qualidade.

Tabela 2: Razão entre o RMS e a distância pico a pico para os espectros obtidos com diferentes velocidades de movimentação do espelho.

Velocidade do Espelho	Razão
0,9494	4,90
0,6329	5,45

Verificou-se que, conforme o esperado, o espectro de melhor qualidade foi o obtido quando o espelho foi movimentado com a velocidade de 0,6329 cm/s, ou seja, com a menor velocidade, sendo a diferença entre as razões é maior que 10%. Portanto, na aquisição dos espectros o espelho do interferômetro foi movimentado com velocidade de 0,6329 cm/s.

CONCLUSÃO

Os espectros com melhor qualidade de sinal foram obtidos com resolução de 4 cm^{-1} , 40 varreduras e com o espelho móvel do interferômetro movendo-se com velocidade de 0,6363 cm/s.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Biotério da Faculdade de Medicina da USP, e as agencias de fomento: CAPES (0349/05-4), FAPESP (05/51689-2), CNPq (573916/2008-0).

REFERÊNCIAS

- [1] Spencer, P., Trylovich, D.J. e Cobb, C.M, "Chemical Characterization of Lased Root Surfaces Using FTIR Photoacoustic Spectroscopy", J. Periodontol 63(7), 633-636 (1992).
- [2] Sasaki, S.K., Aoki, K.M., Masumo, A., Ishinose, S., Yamada, S. e Ishikawa I, "Compositional analysis of root cementum and dentin after Er,YAG laser irradiation compared with CO₂ lased and intact root using Fourier transformed infrared spectroscopy", J. Periodontal Research 37, 50-59 (2002).
- [3] Rabelo, J.S., Benetti, C; Ana, P.A, Valério, M.E.G. e ZEZELL, D.M, "Changes in Dental Enamel oven Heated or Irradiation with Er,Cr:YSGG Laser. Analysis by FTIR", Laser Physics, 20(4), 871-875 (2010).
- [4] Skoog, D.A., Holler, F.J. e Nieman, T.A "Principles of Instrumental Analysis", 5 Ed. USA: Harcourt Brace College Publishers, (1998).