



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus São José dos Campos

LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO

**ANÁLISE DE QUEILITE ACTÍNICA POR
ESPECTROSCOPIA MICRO FT-IR**



2011

LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO

**ANÁLISE DE QUEILITE ACTÍNICA POR ESPECTROSCOPIA
MICRO FT-IR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Adj. Janete Dias Almeida

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

C253a Carvalho, Luis Felipe das Chagas e Silva de.
Análise de queilite actínica por espectroscopia micro FT-IR / Luis Felipe das
Chagas e Silva de Carvalho. __ São José dos Campos : [s.n.], 2011
81f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de
São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Profa. Dra. Janete Dias Almeida

1. Queilite. 2. Análise espectral. 3. Espectroscopia infravermelho
transformada de Fourier. I. Almeida, Janete Dias. II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD79

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio
convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 20 de junho de 2011.

Assinatura :

E-mail: luisfelipecarvalho@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Adj. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof. Adj. Luiz Antônio Guimarães Cabral

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Universidade de São Paulo campus São Carlos (USP-São Carlos)

Prof^a. Dr^a. Luciane Dias de Oliveira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof Adj. Fábio Ramôa Pires

Faculdade de Odontologia

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

*Esta tese é dedicada aos meus pais **Luiz** e **Elenira** pelos ensinamentos que passaram para mim e meus irmãos até agora, e tentarem nos mostrar o caminho certo pra tudo.*

*Mais uma vez **Ele** estava comigo, agradeço antes de tudo a **Deus***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **Profª. Janete Dias Almeida** e ao **Prof. Herculano da Silva Martinho**, meus orientadores, primeiramente agradeço por confiarem em mim quando optei por fazer os dois doutorados juntos. Com muita competência, dedicação e paciência eles me orientaram não só para que esta pesquisa fosse desenvolvida, mas também para que eu me tornasse um profissional digno de receber o título de doutor.*

*Ao **Prof. Luiz Antônio Guimarães Cabral**, meu professor, orientador e amigo, que me proporcionou inúmeros ensinamentos durante o mestrado e o doutorado. Principalmente por me mostrar o quão importante é a observação direta dos pacientes, e pelos momentos de descontração que passamos. Muito Obrigado.*

*Aos **meus irmãos Vinícius e Ludmilla**, minhas avós **Pedro e Eva (in memorian)** e **Bispo (in memorian)** e **Odete**, pelo acolhimento familiar e exemplos de vida que sem dúvida foram imprescindíveis para minha formação.*

AGRADECIMENTOS

*Ao diretor **Prof. Dr. José Roberto Rodrigues** diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade da realização do Doutorado;*

*A **Profª. Drª. Cristiane Yumi Koga-Ito**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, da mesma instituição, pela oportunidade e disponibilidade para esclarecimentos no decorrer do curso;*

*Aos **docentes** do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pelo crescimento profissional; em especial à **Profª. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho**, **Profª. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha**, **Profª. Drª. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, **Profª. Ana Lia Ambinder** pelo conhecimento transmitido durante o curso;*

Aos docentes da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, Prof. Adj. **Ana Sueli Rodrigues Cavalcante** e Prof. Titular **Walter Domingos Niccoli-Filho** pelo convívio;

À bibliotecária **Silvana Alvarez** pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas relacionadas à apresentação da tese;

Ao funcionário **Ivan** pela convivência e auxílio no Ambulatório;

Aos funcionários da Pós-Graduação **Rose, Erena e Maria Aparecida e Bruno** pelo auxílio em todos os momentos;

Aos amigos de pós-graduação **Fernando, Flávio, Rogério, Ana Paula, Lilibeth, Dennia, Michelle**, por tornarem os dias mais descontraídos e pela solidariedade;

Aos amigos da restauradora **Priscila, Marina, Corazza, Lucas**, e em especial ao **Humberto (gaúcho)** que se tornou um grande amigo o qual vou levar pra toda vida, pelas festas e muitos momentos de alegria durante esses anos de doutorado;

Aos meus amigos e companheiros de ambulatório **Dárcio, Mônica, Jucely, Vítor, Celina, Gláuber**, pelo aprendizado

proporcionado em todos esses anos, pela amizade e ajuda que sempre precisei, e pela colaboração na coleta das amostras;

*Aos amigos da UFABC **Thamires, Thiago, Érika, Taciana, Mariana, Thaís**: pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental e pela amizade;*

*A **todos os meus amigos e amigas**, pelo apoio que sempre me deram;*

*Aos funcionários **Ana, Sérgio e Édson** pelo companheirismo e amizade;*

*Ao coordenador de saúde bucal da prefeitura de Cachoeira Paulista **Dr. Leandro Rezende**, e ao cirurgião-dentista, **Dr. Rafael Franco**, pelo auxílio na reta final colaborando imensamente para coleta das amostras*

*Aos **pacientes**, pelo consentimento na participação do presente estudo;*

*A **Capes**, pela bolsa de doutorado concedida através do Programa de Pós-graduação em Nanociência e Materiais*

Avançados, da Universidade Federal do ABC, que foi imprescindível para que eu finalizasse minha pesquisa;

*A **FAPESP** pelo auxílio concedido, o qual ajudou muito na coleta das amostras.*

“Nenhum sacrifício me espantou. No entanto, vós o sabeis, meus primeiros passos toparam mais em espinhos que em rosas! Sim o sofrimento estendeu-me os braços, e lancei-me nele com amor... Quando se quer atingir um fim, é preciso aplicar os respectivos meios”.

Santa Terezinha do Menino Jesus

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
RESUMO	18
ABSTRACT.....	20
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Queilite actínica.....	25
2.2 Técnicas de espectroscopia.....	29
2.2.1 Espectroscopia FT-IR.....	30
2.3 Biópsia Óptica.....	32
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Obtenção das amostras	38
4.1.1 Armazenamento das amostras.....	38
4.1.2 Transporte das amostras	39
4.2 Espectroscopia Micro FT-IR	40

4.3 Preparação das amostras	41
4.4 Análise dos espectros FT-IR.....	44
4.5 Análise histopatológica.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Análise histopatológica.....	47
5.2 Análise dos espectros FT-IR.....	49
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	68
8 REFERÊNCIAS	69
ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro eletromagnético. Observar que a radiação UV localiza-se na região das radiações ionizáveis, podendo levar alterações nos tecidos epiteliais e conjuntivos que podem ter potencial cancerizável	26
Figura 2 - Aspecto clínico da queilite actínica.	27
Figura 3 - Espectrômetro FT-IR Varian 610 e 660.....	40
Figura 4 - Placa de Platina com a amostra e pinça clínica ao lado. Esse conjunto placa/amostra foi levado ao equipamento para aquisição dos espectros.....	42
Figura 5 - Acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) para Micro FT-IR.	42
Figura 6 - Conjunto placa/amostra, mostrando o contato da amostra com o cristal do ATR.	43
Figura 7 - esquema de atuação do feixe de luz sobre a amostra para obtenção dos espectros.	44
Figura 8 - Aspectos histopatológicos das amostras de queilite actínica, mostrando em cima as características do epitélio, como intensa acantose, e uma camada espessa de queratina, e abaixo detalhe para degeneração basofílica do colágeno, que ficou evidente em todas as amostras de QA.....	48

Figura 9 - Gráfico de Box Plot das amostras de MN (acima) e QA (abaixo) da região de fingerprint. A linha preta refere-se a média dos espectros, e o sombreado em cinza relaciona-se ao desvio padrão dos mesmos.49

Figura 10 - Gráfico de Box Plot das amostras de MN (acima) e QA (abaixo) da região de altos números de onda. A linha preta refere-se a média dos espectros, e o sombreado em cinza relaciona-se ao desvio padrão dos mesmos.50

Figura 11 - Gráfico de Scree Plot. Relação entre os componentes principais e os autovalores, mostrando quais PCs devem ser utilizados para análise estatística. O PC10 ainda contribuiu para classificação dos espectros.52

Figura 12 - Gráfico de Loading Plot da região de fingerprint. Observar a relação de intensidade positiva e negativa comparando-se ao PC1. Verificar que o PC10 também apresenta informações em algumas bandas que foram utilizadas para classificação dos espectros, confirmando o resultado mostrado no gráfico de Scree Plot.....53

Figura 13 - Gráfico de Loading Plot da região de altos números de onda. Observar a relação de intensidade positiva e negativa comparando-se ao PC1. Verificar que o PC10 também apresenta informações em algumas bandas que foram utilizadas para classificação dos espectros, confirmando o resultado mostrado no gráfico de Scree Plot.....54

Figura 14 - Relação da porcentagem de pares concordantes e do número de PCs utilizados para análise de regressão logística binária na região de fingerprint. Notar que quanto menor for o número de PCs utilizados ocorre uma diminuição na porcentagem dos pares concordantes.....58

Figura 15 - Relação da porcentagem de pares concordantes e do número de PCs utilizados para análise de regressão logística binária

na região de altos números de onda. Notar que quanto menor for o número de PCs utilizados ocorre uma diminuição na porcentagem dos pares concordantes.....59

Figura 16 - Curva ROC. Observar a área sob a curva, mostrando que a região de altos números de onda apresenta um valor maior do que a região de fingerprint.60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros de Aquisição dos espectros FT-IR.....	44
Quadro 2 - Modos vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e QA para a região espectral de fingerprint. (Movasaghi et al., 2008).	56
Quadro 3 - Modos vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e QA para a região de altos números de ondas. (Movasaghi et al., 2008).	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR = Attenuated Total Reflection

CCNH = Centro de Ciências Naturais e Humanas

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

FAPESP = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

FT = Fourier transform

IR = infrared

MN = mucosa normal

PCs = componentes principais

PCA = principal components analysis

QA = queilite actínica

RLB = regressão logística binária

ROC = Receive Operator Characteristic

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFABC = Universidade Federal do ABC

UNESP = Universidade Estadual Paulista

UV = ultravioleta

Carvalho LFCS. Análise de queilite actínica por espectroscopia micro FT-IR [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma lesão considerada potencialmente cancerizável, localizada principalmente em lábio inferior e causada pela exposição crônica à radiação UV. A Espectroscopia FT-IR fornece informações moleculares através de fenômenos ópticos observado pela vibração de suas moléculas. Tem sido empregada em estudos biológicos para a caracterização de alterações neoplásicas. No entanto, são escassos os estudos que envolvam processos potencialmente cancerizáveis. Objetivou-se avaliar QAs através da espectroscopia micro FT-IR com relação aos seus aspectos moleculares para região de fingerprint ($900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) e altos números de onda ($2800\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$), e ainda verificar a análise dos componentes principais (PCA) e regressão logística binária (RLB) como modelo de diagnóstico. Foram avaliadas 14 amostras de QA e 14 amostras de mucosas normal (MN), obtendo-se 5 espectros por amostra, totalizando 140 espectros avaliados (70 de cada grupo). Os resultados demonstrados pela análise dos componentes principais revelaram pelo gráfico de *scree plot* que os dez primeiros PCs deveriam ser utilizados na análise. As maiores variações observadas pelo gráfico de *loading plot* relacionaram-se aos modos vibracionais do colágeno, ácidos nucléicos, lipídios e água confinada. O modelo de regressão logística binária mostrou 80,6% de pares concordantes para região de fingerprint e 81,7% de pares concordantes para a região de altos números de onda. Concluiu-se que a espectroscopia micro FT-IR provê características moleculares importantes das

amostras de QA, evidenciadas tanto na região de fingerprint como na de altos números de onda

Palavras-chave: Queilite. Análise espectral. Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier.

Carvalho LFCS. Analysis of actinic cheilitis by micro spectroscopy FT-IR [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially precancerous lesion, located primarily in lower lip caused by chronic exposure to UV radiation. The FT-IR spectroscopy provides molecular information through optical properties observed by the vibration of its molecules. This technique has been used in biological studies for characterization of neoplastic tissues. However, there are few studies involving potentially cancerous processes. This study aimed to evaluate molecular changes on AC through micro FT-IR spectroscopy in fingerprint ($900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) and high wave numbers ($2800\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) region, and also to verify the principal components analysis (PCA) and binary logistic regression (BLR) as a model of diagnosis. We evaluated 14 samples of AC and 14 samples of normal mucosa (NM), resulting in 5 spectra per sample, totalling 140 spectra analyzed (70 from each group). The results demonstrated by PCA revealed by scree plot graph showed that the first ten principal components (PCs) should be used in the analysis. The largest variations observed by loading graph plot related to the vibrational modes of collagen, nucleic acids, lipids and confined water. The BLR model showed 80.6% of concordant pairs for the fingerprint region and 81.7% of concordant pairs of high wave numbers region. It was concluded that the micro FT-IR spectroscopy provides important molecular features of AC samples, evidenced both in the fingerprint and in the highwave numbers region.

Keywords: *Spectrum analysis. Infrared spectroscopy fourier transform. Chelitis.*

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de pesquisas visando à detecção de alterações de processos patológicos em sua fase inicial tem proporcionado a busca por novos métodos de diagnóstico. O tratamento se torna mais difícil e dispendioso quando os casos são diagnosticados em fase tardia, comprometendo o prognóstico. Muitos autores consideram o exame histopatológico como sendo o padrão-ouro do diagnóstico (Carvalho et al., 2011, Tomasi, 2002). Este exame é realizado através da análise tecidual, obtido através de procedimento cirúrgico de biópsia excisional ou incisional. Outros exames complementares como exames imaginológicos (radiografias, tomografia computadorizada, ressonância magnética), exames laboratoriais (sorológicos, bioquímicos, microbiológicos), entre outros, ainda podem ser requisitados no momento do processo diagnóstico, para auxiliar a elaboração das hipóteses diagnósticas (Lyng et al., 2007) .

Para Holmstrup et al. (2007) muitas características presentes nas interações moleculares da célula ou do tecido avaliado não podem ser demonstradas pelo exame histopatológico. Deste

modo, outros métodos devem ser investigados para auxiliar no diagnóstico dos diversos processos patológicos.

Dentre as técnicas não invasivas de diagnóstico que estão sendo pesquisadas atualmente, podemos destacar a espectroscopia Raman, a espectroscopia por Fluorescência, a espectroscopia de absorção no Infravermelho e o Dicroísmo Circular (Bagnato et al., 2010). A análise de amostras *ex vivo* possibilita a caracterização dos constituintes biológicos e moleculares das mesmas, baseado na análise da estrutura e conformação química, após estimulação pela luz (Andrade et al., 2007; Lyng et al., 2007; Naumann, 2001).

O termo “biópsia óptica” foi preconizado para estes tipos de análises, pois tais técnicas analisam o tecido quanto às suas propriedades ópticas, fornecendo informações adicionais do tecido avaliado e desta maneira auxiliando no processo diagnóstico (Bagnato et al., 2010; Carvalho et al., 2010; Conti et al., 2009; Lyng et al., 2007)

Apesar da necessidade da obtenção de padrões espectrais dos mais diversos tipos de processos patológicos, grande parte dos estudos envolvendo estas técnicas de biópsia óptica ainda dedica-se somente a comparações de espectros provenientes de neoplasias malignas e mucosas normais (Kendall et al., 2010; Conti et al., 2009; Kurachi et al., 2008; Lyng et al., 2007; Malini et al., 2006; Li et al., 2005; Wang et al., 2003). Estudos com tais técnicas

para análise de lesões inflamatórias e que tenham potencial de transformação maligna são escassos na literatura (Carvalho et al., 2010; Andrade et al., 2007; Cheng et al., 2005; Mahadevan et al., 1998). Diante disso, é oportuno o estudo de queilite actínica, a qual é considerada uma lesão que apresenta um potencial evolutivo para o carcinoma epidermóide labial (Amishi et al., 2010; Nico et al., 2007).

A utilização dessas técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia FT-IR (Jackson, Sowa, 1997), pode auxiliar na obtenção de parâmetros que podem ser utilizados para verificar alterações patológicas em nível bioquímico, biológico, estrutural e morfológico, sempre objetivando que estas alterações sejam observadas o mais precocemente possível.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queilite actínica

A queilite actínica (QA) é uma lesão considerada potencialmente cancerizável, localizada no vermelhão labial, especialmente no lábio inferior, que desenvolve-se principalmente devido à exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta. Esta condição está relacionada na maioria dos casos em paciente leucodermas, e que ainda tem hábitos diários de exposição a luz solar. Sendo então segundo Regezzi et al., 2005 intimamente relacionada com a exposição cumulativa total à radiação UV e inversamente à quantidade de pigmentação cutânea. A queilite actínica apresenta padrão e comportamento fisiopatológico similar à queratose actínica da pele (Ulrich et al., 2011; Neville et al., 2009).

Os comprimentos de onda que estão na faixa do ultravioleta (290 e 320 nm) do espectro eletromagnético (Figura 1) são os responsáveis por causar alterações nas células epiteliais, que podem levar às mesmas a apresentarem potencial de transformação maligna. Essa radiação também pode levar a alterações do tecido

conjuntivo, observadas principalmente como a elastose solar, ou degeneração basofílica do colágeno (Amishi et al., 2010; Cavalcanti et al., 2008).

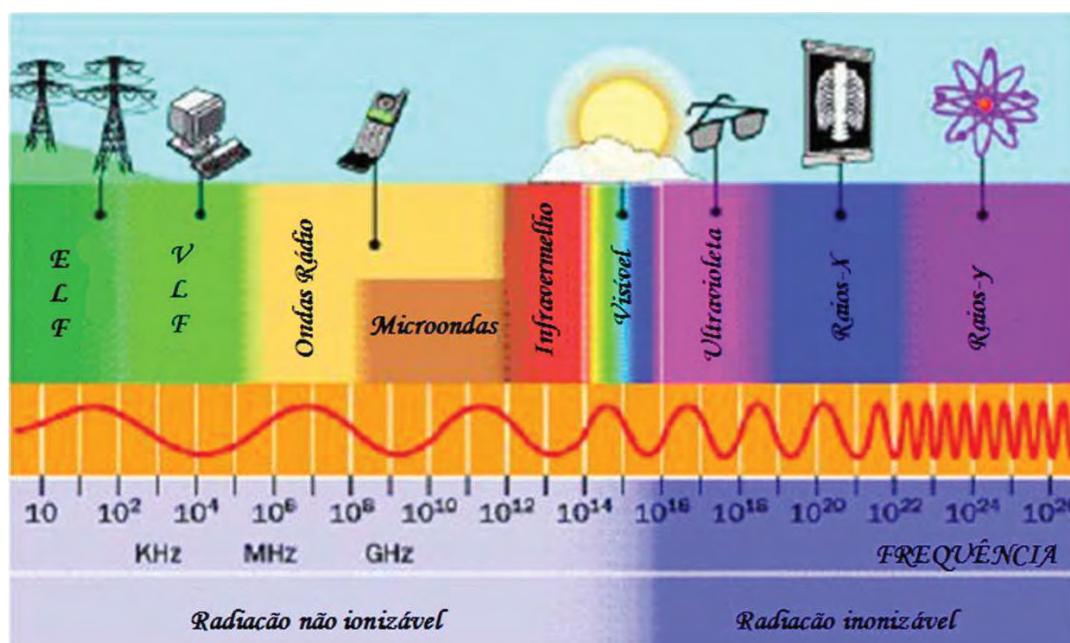


Figura 1 - Espectro eletromagnético*. Observar que a radiação UV localiza-se na região das radiações ionizáveis, podendo levar alterações nos tecidos epiteliais e conjuntivos que podem ter potencial cancerizável. Como exemplo de radiações não ionizáveis, além das ondas de infravermelho, microondas e ondas de rádio, existem as ondas VLF (very low-frequency) e ELF (extremely low-frequency).

Clinicamente a lesão é principalmente observada em pacientes acima de 45 anos, e maioria ocorre no sexo masculino, exatamente pelos homens estarem mais exposto à radiação UV devido às condições de trabalho. As lesões têm um curso clínico

* Fonte: <http://www.ocaduceu.com.br/web/?p=220>

lento, e o vermelhão dos lábios afetados apresenta um aspecto pálido, edemaciado e atrófico. Frequentemente são observados fissuras e enrugamentos em ângulo reto com a junção mucocutânea. Nos casos avançados, esta junção pode estar totalmente apagada ou irregular, e áreas leucoplásicas também podem ser notadas. Podem ser observadas áreas de descamação, rachaduras e ulcerações superficiais, as quais podem estar intimamente relacionadas à um estágio inicial do carcinoma epidermóide (Cavalcanti et al., 2008; Nico et al., 2007) (Figura 2).



Figura 2 - Aspecto clínico da queilite actínica*.

*Fonte: Arquivo da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC/UNESP.

As alterações histopatológicas das queilites actínicas são observadas em epitélio e tecido conjuntivo. O epitélio caracteriza-se por apresentar-se atrófico, porém em alguns casos são observados áreas de acantose e marcante produção de queratina, que apresenta espessura variável. É importante ressaltar que vários graus de atipias podem ser observados, levando o patologista a classificar as QAs lesões com atipia discreta, moderada ou severa. As alterações observadas no tecido conjuntivo caracterizam-se como elastose solar, ou degenerações basofílicas do colágeno e das fibras elásticas. Também podem ser observados vasos teleangiectásicos (Nico et al., 2007).

O tratamento está diretamente relacionado ao grau de atipia que será observado na análise histopatológica sendo o prognóstico imprevisível e. De qualquer maneira os pacientes devem ser orientados quanto aos procedimentos preventivos, uma vez que se trata de uma lesão com potencial de transformação maligna (Ulrich et al., 2011; Amishi et al., 2010). Tais procedimentos incluem uma diminuição à exposição diária à radiação UV, que também pode ser auxiliada com o uso de protetor solar labial, chapéu de abas largas, no caso dos homens o uso do bigode, e a consulta periódica ao estomatologista.

Se o paciente apresentar áreas de ulceração superficial devem ser realizadas biópsias incisionais, para esclarecimento da lesão quanto ao grau de atipia. Em todos os casos o acompanhamento

por longo período é recomendado, e no caso de lesões com atipias severas o tratamento radical, como a vermelhenectomia, poderá ser instituído (Amishi et al., 2010).

2.2 Técnicas de espectroscopia

A espectroscopia é a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. De maneira direta, são obtidas as diferenças entre estes níveis de energia a partir de medidas que determinam as posições relativas dos níveis energéticos. No caso das moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis energéticos envolvidos: eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais. Assim, as vibrações moleculares podem ser medidas por diferentes técnicas como a espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção no Infravermelho, ou através da análise da “nuvem” eletrônica como a espectroscopia de absorção Eletrônica e a espectroscopia de Fluorescência e (Naumann, 2001; Sala, 1995).

2.2.1 Espectroscopia FT-IR

Novos métodos ópticos têm sido desenvolvidos numa tentativa de realizar diagnósticos precoces, podendo fornecer em tempo real informações sobre os tecidos; entre elas, está a espectroscopia de Infravermelho cuja análise é feita com base trigonométrica, a qual é denominada transformada de Fourier (FT-IR) que é utilizada para explorar as mudanças da microarquitetura e bioquímica dos tecidos. A espectroscopia FT-IR pode ser considerada uma potente ferramenta de diagnóstico quando comparada a outras técnicas, porque requer uma pequena quantidade de amostra que pode ser analisada em diferentes formas e estados físicos, não exigindo qualquer tipo de corante ou fixação. Ainda, a aquisição dos espectros ocorre em apenas alguns segundos e desta forma pode-se obter uma análise tecidual das alterações causadas pelos processos patológicos de maneira rápida e não subjetiva (Conti et al., 2008, 2009; Lin et al., 2007; Bostrom et al., 2006; Petibois, Deléris, 2006; Li et al., 2005; Wang et al., 2003).

Esta técnica baseia-se no fato de que os grupos funcionais de todas as moléculas vibram em temperatura ambiente. Quando a luz infravermelha incide sobre a amostra a ser analisada, parte dela é absorvida pelos vários grupos funcionais das moléculas

que são detectadas e apresentadas como um espectro infravermelho (IV). O IV é constituído por bandas com frequência e intensidade diferentes, as quais estão relacionadas com o modo vibracional e com propriedades polares, bem como com a concentração relativa de cada um dos grupos funcionais. Com a alteração das propriedades estruturais e dos grupos funcionais as bandas também serão mudadas (Naumann, 2001; Sala, 1995).

Para análise dos espectros podemos avaliar duas regiões distintas. A região conhecida como *fingerprint*, ou impressão digital, que localiza-se entre 900 e 1800 cm^{-1} e está relacionada a várias macromoléculas como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos, entre outras. A região localizada entre as frequências de 2800 e 3600 cm^{-1} é conhecida por altos números de ondas, apesar de não ser muito estudada quanto a região de fingerprint, apresenta informações importantes relacionadas as vibrações de CH_2 , CH_3 , NH e OH , correspondentes, à lipídios, fosfolipídios e a água confinada (Carvalho et al., 2010; Conti et al, 2008; Lin et al., 2007; Gniadecka et al., 2003; Naumann, 2001).

2.3 Biópsia Óptica

As técnicas de biópsia óptica evidenciam alterações bioquímicas e estruturais, fornecendo dados que podem ser utilizados para obtenção de diagnóstico precoce e diferencial de várias lesões, podendo estas informações ser obtidas em tempo real (Movasaghi et al., 2008; Penteado et al., 2008; Lyng et al., 2007; Malini et al., 2006; Cheng et al., 2005; Osada et al., 2004). A histopatologia fornece informações morfológicas do tecido avaliado, entretanto o diagnóstico pode levar alguns dias para que seja concluído (Holmstrup et al., 2007; Gniadecka et al., 2004). Nos estudos de tecidos biológicos que apresentavam alterações malignas, a simples observação visual dos espectros obtidos foi suficiente para diferenciar as amostras (Kurachi et al., 2008).

Os tecidos com neoplasia maligna demonstram espectros mais irregulares e com mais “ruídos” do que os de tecido normal (Venkatakrishna et al., 2001). Desse modo, uma observação mais apurada dos espectros permitirá identificar grandes diferenças espectrais em algumas regiões, as quais correspondem aos modos vibracionais alterados devido ao processo patológico (Kendall et al., 2010; Carvalho et al., 2010; Conti et al., 2009; Kurachi et al., 2008; Andrade et al., 2007; Lyng et al., 2007; Malini et al., 2006; Li et al., 2005; Wang et al., 2003).

A patogênese e o desenvolvimento do câncer são processos multifatoriais controlados por vários genes. A cooperação dos oncogenes e dos antioncogenes na inativação do processo neoplásico causa mudanças significativas nos conteúdos estruturais de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios intracelulares. As mudanças supracitadas podem ser analisadas pela espectroscopia FT-IR, possibilitando o diagnóstico de células neoplásicas em nível molecular (Conti et al., 2009; Lin et al, 2007; Worangasavu, 2007 Bostrom et al., 2006; Petibóis, Deléris, 2006; Li et al., 2005; Wang et al., 2003; Levine, Wetzel, 1998; Jackson, Sowa, 1997).

A espectroscopia FT-IR foi aplicada pelos autores Levine et al. (1998) com eficácia para diagnóstico de doenças como a esclerose múltipla. Uma amostra da substância branca da região subcortical do cérebro com esclerose múltipla foi avaliada conjuntamente com amostras controle de indivíduos que morreram sem nenhuma doença do sistema nervoso central. A partir das medições da FT-IR, os autores obtiveram análise dos dois tecidos observando absorções de padrões similares que são encontrados principalmente nos lipídios, fosfolipídios e glicolipídios. Evidenciaram principalmente que nesta condição patológica algumas moléculas como proteínas e lipídios estão oxidadas, confirmando a hipótese de que radicais livres estão envolvidos com a patogênese da esclerose múltipla.

Como citadas anteriormente várias são as técnicas disponíveis para diagnóstico de processos patológicos. Petibois e Deléris 2006 revisaram os recentes avanços da espectroscopia FT-IR para análise e diagnóstico de células neoplásicas e tecidos de com neoplasia maligna de origem cerebrais. Devido ao mínimo tempo necessário para obtenção dos espectros, concluíram que a espectroscopia FT-IR deve ser desenvolvida para aplicação clínica, para permitir a união entre informações morfológicas e moleculares, e auxiliar os histopatologistas no diagnóstico do câncer.

Bostrom et al. 2006 desenvolveram um estudo com a espectroscopia FT-IR analisando as alterações moleculares causadas pelo desenvolvimento de osteoartrite. Foram observados os seguintes aspectos: quantidade de prostaglandinas, orientação das fibrilas de colágeno, conteúdo e integridade molecular do colágeno. Assim, foi realizada uma análise comparativa dos tecidos cartilagosos normais e patológicos que foram coletados de pacientes do sexo masculino e feminino com idade entre 46 e 87 anos durante a cirurgia do joelho. A comparação demonstrou principalmente redução de colágeno e prostaglandinas, além da perda da orientação das fibras de colágeno, diminuição da atividade dos condrócitos em relação a produção suficiente de prostaglandinas e aumento da sua atividade com relação a degradação de colágeno. A alteração foi observada na região de 1338 cm^{-1} , no qual houve uma redução da assinatura espectral que indica danos no colágeno tipo II encontrado no início do

desenvolvimento da osteoartrite. Sendo assim, os autores confirmaram que a FT-IR é capaz de fornecer informações detalhadas sobre as cartilagens, demonstrando é uma importante ferramenta de diagnóstico.

Conti et al. 2008, avaliaram câncer de colon por espectroscopia micro FT-IR. Neste estudo citaram que a técnica apresentou resultados satisfatórios de acordo com os achados patológicos. Mesmo as composições dos tecidos avaliados sendo complexa, em média, os espectros puderam representar grupos com características neoplásicas e grupos com característica de normalidade, podendo ser utilizados como padrão para mapeamento lesional. Concluíram não ser possível diferenciar entres os estágios iniciais das patologias e os tecidos normais, relacionando este achado ao número limitado de amostras avaliadas.

3 PROPOSIÇÃO

O estudo teve como proposição a análise de amostras *ex vivo* de QA através da espectroscopia micro FT-IR, avaliando as características das mesmas em nível molecular, para região de *fingerprint* e altos números de onda, relacionando os espectros obtidos aos achados histopatológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOSJC/UNESP) sob protocolo 032/2010-PH/CEP (Anexo A).

O desenvolvimento da pesquisa envolve duas Instituições de Ensino Superior: FOSJC/UNESP e o Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC).

Os pacientes atendidos no ambulatório de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC/UNESP com indicação de biópsia incisional de queilite actínica foram convidados a participar da pesquisa. Os pacientes receberam informação relacionada aos procedimentos e objetivo da pesquisa e aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após a leitura e esclarecimento (Anexo B).

4.1 Obtenção das amostras

As amostras de queilite actínica foram obtidas de fragmentos de biópsia incisional no total de 14 amostras de queilite actínica. Como rotina clínica, as biópsias em QAs são realizadas em região que apresente áreas eritematosas, ulceradas e/ou esbranquiçadas. Amostras de mucosa normal (n=14) foram obtidas, quando possível, de fragmentos de biópsia incisional ou excisional de lesões de mucosa labial inferior, como mucocèle, que tenham margem cirúrgica estendida de acordo com a indicação terapêutica para obtenção de parâmetros visando à avaliação dos espectros.

4.1.1 Armazenamento das amostras

Um fragmento medindo cerca de 2 mm de comprimento foi excisado da peça cirúrgica, lavado com solução fisiológica a 0,9 % (NaCl) Aster®, colocado em tubo criogênico Nalgene® devidamente identificado e numerado, e imediatamente armazenado em freezer (-70°C) Thermo Scientific LTDA.

A peça cirúrgica foi fixada em formol a 10 % para análise histopatológica e encaminhado ao Laboratório de Patologia

do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC/UNESP.

4.1.2 Transporte das amostras

As amostras foram transportadas até o laboratório da UFABC, localizado em Santo André, São Paulo. O transporte foi realizado em galões de nitrogênio líquido próprios para o transporte, evitando o descongelamento e a possível degradação das amostras antes da análise dos espectros FT-IR. A análise foi realizada sob orientação do Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho, do CCNH da UFABC.

O acondicionamento e transporte foram realizados segundo a resolução **CFM nº 1.823/2007**, publicada no D.O.U. 31 de agosto de 2007, Seção I, pág. 119, que normatiza o acondicionamento de material humano coletado para procedimentos diagnósticos a serem transportados para outra localidade que não a da sede da coleta; e também baseado nos critérios estabelecidos pela Anvisa para realização deste procedimento pelos laboratórios clínicos na seção 6.1.10 Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA/Ministério da Saúde) – **RDC nº 302**, de 13 de outubro de 2005.

4.2 Espectroscopia Micro FT-IR

Os espectrômetros instalados na Central Experimental Multi-usuário da UFABC, FT-IR 660 e FT-IR 610 – *Varian Inc* foram utilizados para aquisição dos dados espectrais (Figura 3).



Figura 3 - Espectrômetro FT-IR Varian 610 e 660.

4.3 Preparação das amostras

O descongelamento das amostras foi realizado solução fisiológica a 0,9 % (NaCl) Aster®, no momento da utilização no experimento. Após o descongelamento, com o auxílio de uma pinça clínica, a amostra foi colocada em um substrato de platina (Figura 4). Os espectros foram obtidos com o feixe de luz passando primeiramente pelo epitélio e depois pelo tecido conjuntivo, objetivando um modelo para análise *in vivo*. Este conjunto foi levado ao espectrômetro Micro FT-IR para obtenção dos espectros com o auxílio do acessório de reflexão total atenuada (Attenuated total reflection-ATR) (Figura 5).

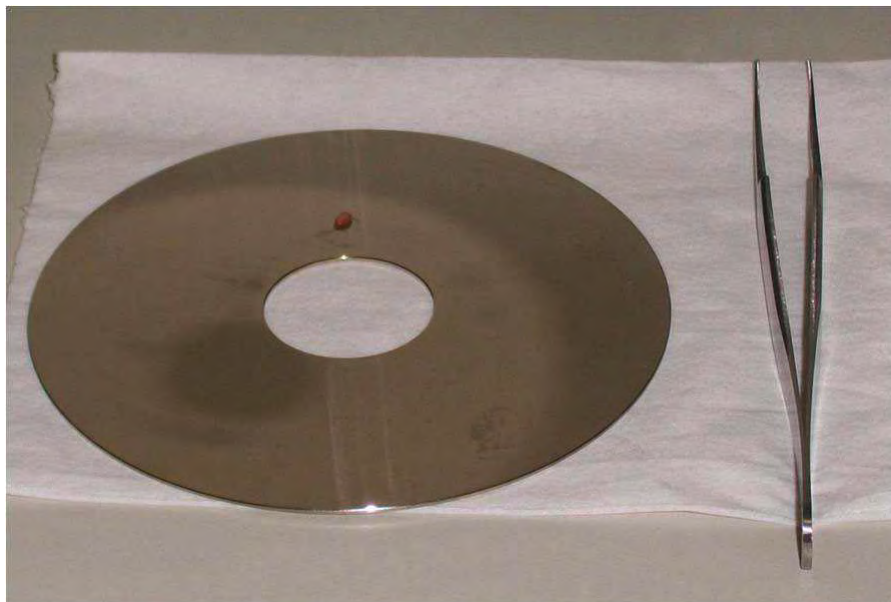


Figura 4 - Placa de Platina com a amostra e pinça clínica ao lado. Esse conjunto placa/amostra foi levado ao equipamento para aquisição dos espectros.



Figura 5 - Acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) para Micro FT-IR.

Assim, os espectros foram obtidos quando ocorreu um leve contato entre a amostra que está sobre o substrato de platina com o cristal do acessório de ATR (Figura 6).

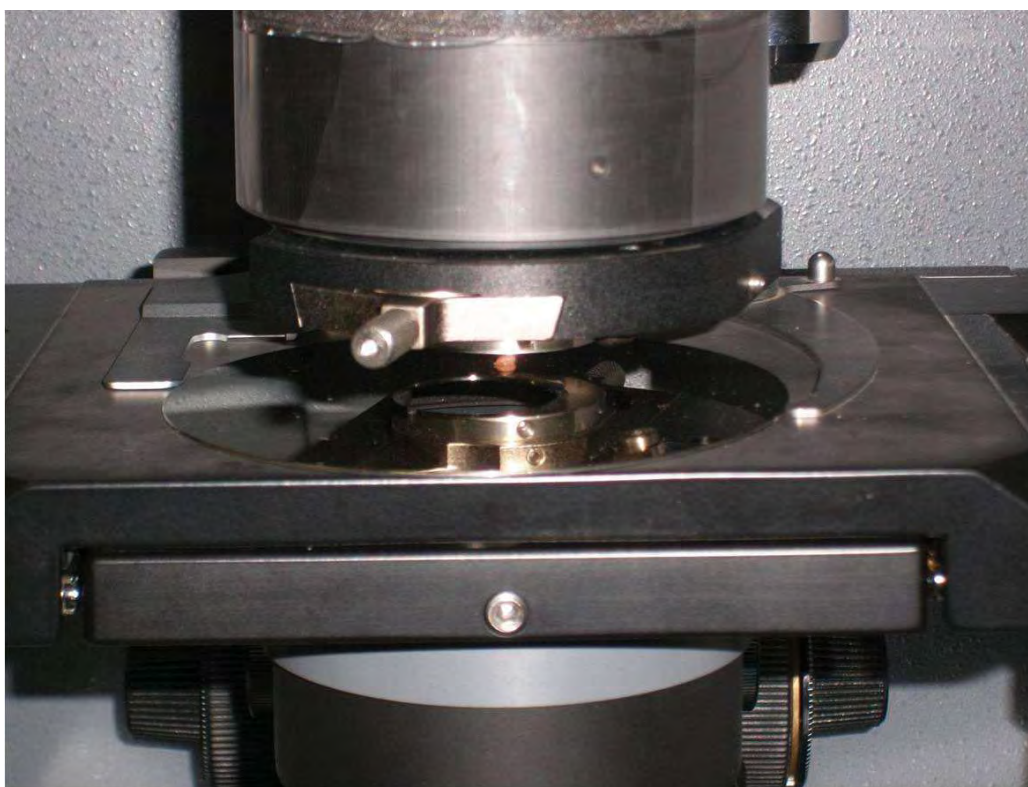


Figura 6 - Conjunto placa/amostra, mostrando o contato da amostra com o cristal do ATR.

Antes da análise, foi realizado um *background* com 800 *scans*, e depois a amostra foi colocada no substrato de platina, o qual recebeu um total de 400 *scans* para obtenção dos espectros. Cada

amostra foi analisada em 5 pontos diferentes visando a avaliação na maior extensão possível pela técnica de Micro FT-IR (Figura 7).

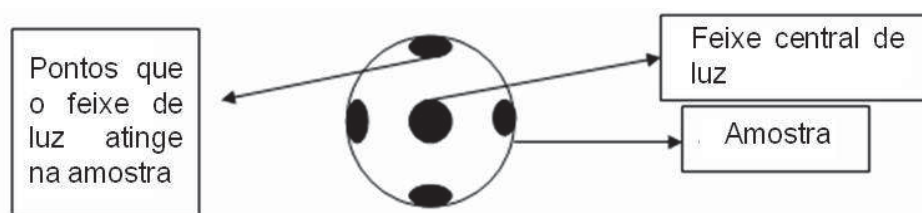


Figura 7 - Esquema de atuação do feixe de luz sobre a amostra para obtenção dos espectros.

Quadro 1 - Parâmetros de Aquisição dos espectros FT-IR

Espectrômetro FT-IR	Parâmetros de Aquisição
N varreduras <i>background</i>	800 scans
Tempo médio <i>background</i>	4 minutos
N varreduras amostra	400 scans
Tempo médio amostra	1 minutos
Resolução	4 cm ⁻¹

4.4 Análise dos espectros FT-IR

Os espectros obtidos e armazenados pelo software de controle do equipamento foram convertidos para o formato ASCII, para posterior processamento e análise no Minitab 14.2[®] e Origin 8[®].

Após a obtenção dos espectros FT-IR, estes foram convertidos para o formato *csv*. Foi realizada então a subtração da linha de base pelo programa FITyK[®], sendo os espectros automaticamente convertido para o formato *dat*. Assim foi realizada a normalização vetorial com o uso do programa Minitab 14.0[®].

Como primeira análise foram construídos gráficos de *Box Plot*, através do software Origin 8.0, que possibilitaram avaliação dos espectros quanto às variações de intensidade e deslocamento com relação ao aparecimento dos picos entre os espectros.

Para classificação dos espectros, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Os resultados da PCA foram apresentados por meio do gráfico de *Loading Plot*, que confrontam os PCs (componentes principais) ao deslocamento FT-IR, favorecendo a identificação das principais bandas que possibilitaram a classificação entre os espectros das amostras.

O modelo de diagnóstico utilizado foi a análise de regressão logística binária, observando-se os pares de concordantes fornecidos pelo teste. Os resultados obtidos por meio desta metodologia de classificação aplicada aos espectros foram validados por meio da Curva ROC (*Receveir Operating Characteristic*). Para verificar a sensibilidade e a especificidade do estudo, foi realizado o cálculo da área abaixo da curva ROC, a qual apresenta associação ao

poder discriminante do teste diagnóstico. As coordenadas deste gráfico (x e y) representam medidas de probabilidade e, por conseguinte, variam de zero a um, o que possibilita obter o valor preditivo do modelo.

4.5 Análise histopatológica

Após a coleta dos espectros, as amostras foram fixadas em solução de formol a 10 % para fixação para análise histopatológica no Laboratório de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC/UNESP.

Para classificação das amostras como queilite actínica foram observadas alterações em epitélio como acantose, hiperplasia dos cones epiteliais, espongiose, variações nas camadas de queratina, podendo a amostra ser considerada como hiperqueratinizada. Também são observadas atipias celulares que levam a caracterização da amostra como atipia discreta, moderada ou severa. No tecido conjuntivo, além do infiltrado inflamatório que pode estar presente, a principal variação observada está relacionada à degeneração basofílica do colágeno, ou elastose solar.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica

A análise histológica dos espécimes de MN estudados evidenciou mucosa de revestimento com aspecto de normalidade e lâmina própria com fibras colágenas dispostas em feixes paralelos e componentes celulares residentes característicos. As amostras do grupo de QA revelaram epitélio acantótico, com atipias epiteliais que variaram de discreta e moderada, e hiperparaqueratinização. O tecido conjuntivo apresentou elastose solar, com degeneração basófila das fibras colágenas, e vasos dispersos pelo estroma. Células inflamatórias também foram observadas em algumas amostras (Figura 8).

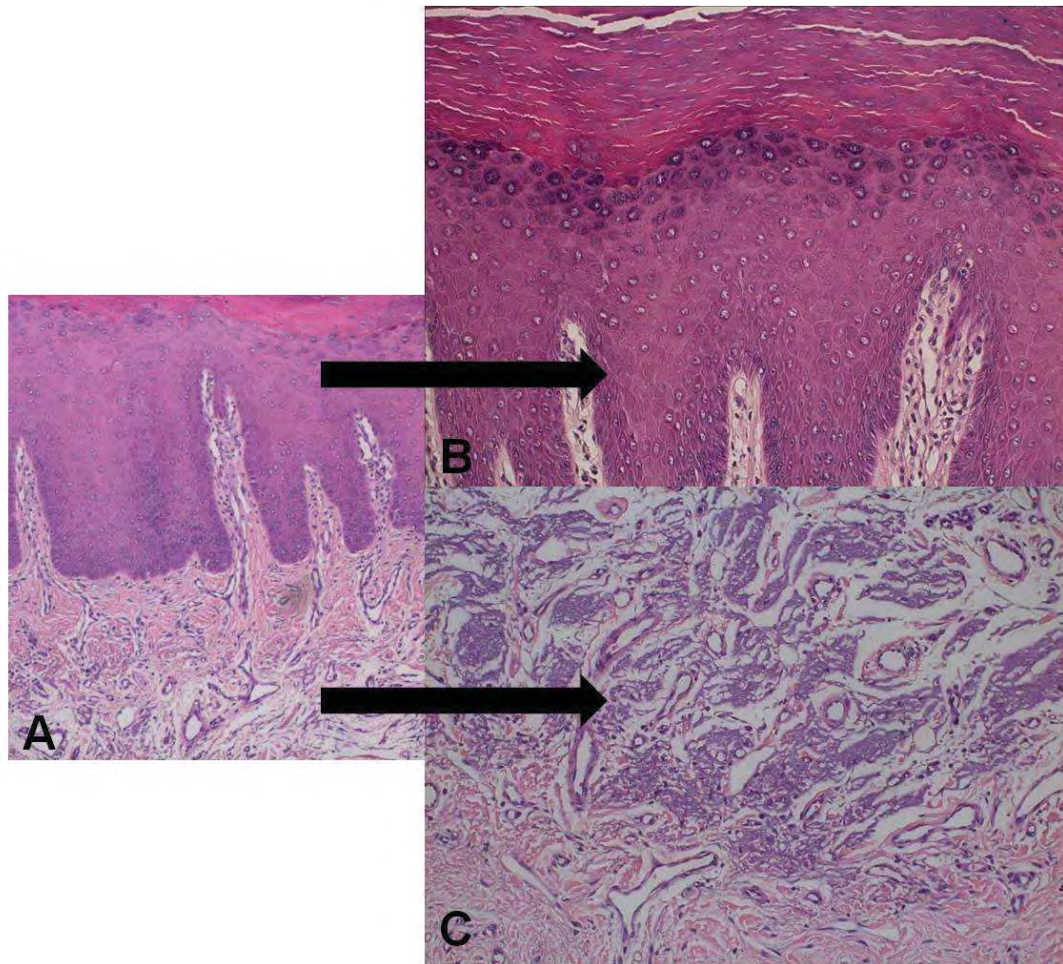


Figura 8 - A) Aspectos histopatológicos das amostras de queilite actínica (HE-10x), mostrando em; B) as características do epitélio, como intensa acantose, e uma camada espessa de queratina (HE-40x), e em; C) detalhe para degeneração basofílica do colágeno, que ficou evidente em todas as amostras de QA (HE-40x).

5.2 Análise dos espectros FT-IR

Após a normalização dos espectros, foi obtida a média destes e o desvio padrão, e construídos gráficos de *box plot* para as amostras de MN e de QA (Figuras 9 e 10).

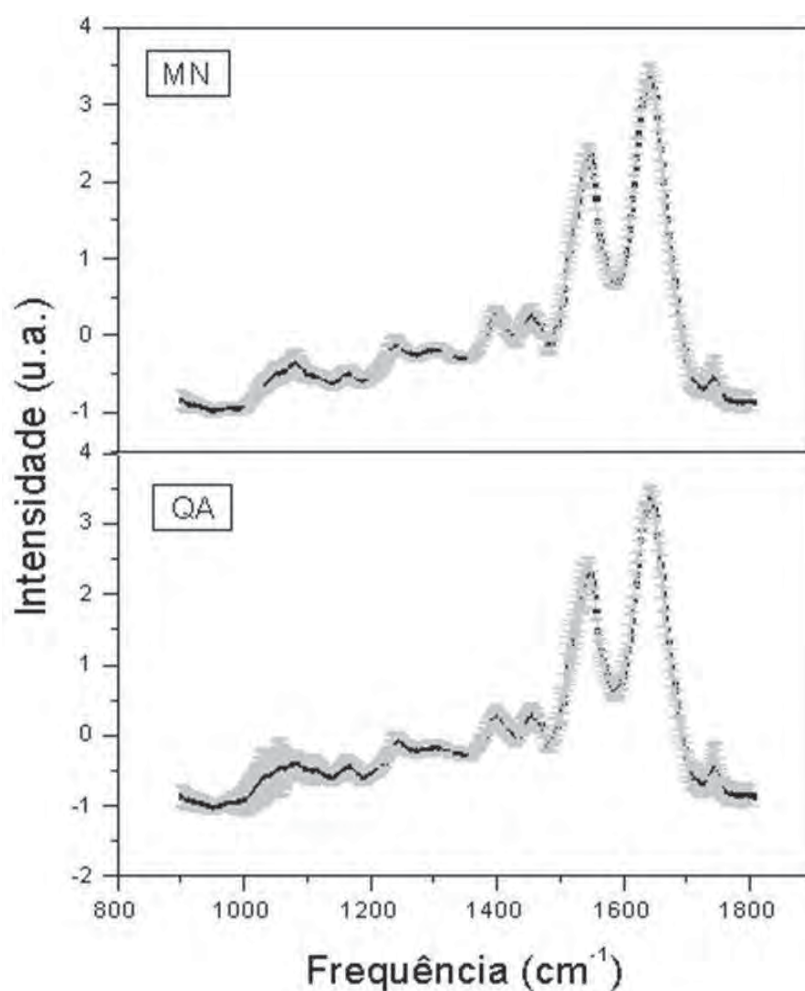


Figura 9 - Gráfico de *Box Plot* das amostras de MN (acima) e QA (abaixo) da região de fingerprint. A linha preta refere-se a média dos espectros, e o sombreado em cinza relaciona-se ao desvio padrão dos mesmos.

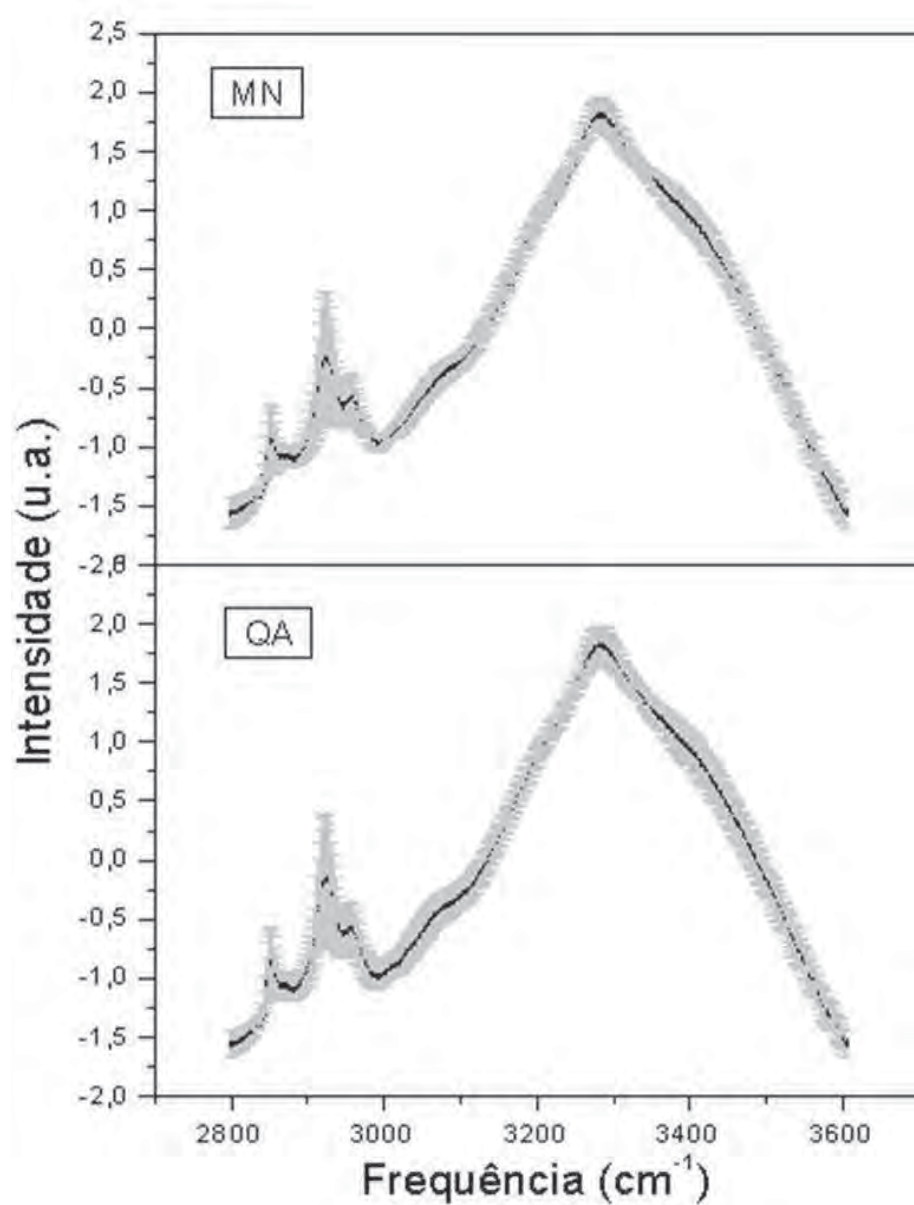


Figura 10 - Gráfico de *Box Plot* das amostras de MN (acima) e QA (abaixo) da região de altos números de onda. A linha preta refere-se a média dos espectros, e o sombreado em cinza relaciona-se ao desvio padrão dos mesmos.

Pela análise simples dos gráficos de *Box Plot* fica difícil uma discriminação entre as amostras e uma correlação entre as bandas que apresentaram maiores variações. Desse modo foi realizado a análise de componentes principais, pois a mesma consegue evidenciar quais são as variáveis que mais estão contribuindo para o modelo de estudo, visto que amostras biológicas apresentam estruturas com características complexas que podem interferir na análise estatística.

Para a classificação dos espectros FT-IR foi realizada a Análise dos Componentes Principais (PCA). Após a obtenção dos dados da PCA foi realizado um teste sobre estes dados para verificação dos autovalores relacionados aos PCs, com o objetivo de verificar quantos PCs deveriam ser retidos na análise. Este teste forneceu o gráfico *Scree Plot*, o qual possibilita a visualização dos autovalores, procurando-se interromper a análise quando há uma dobra na curva, fazendo com que a diferença entre os PCs se torne pequena. No presente estudo esta dobra foi evidenciada a no PC10, fazendo com que a análise de regressão logística binária para separação das amostras de MN e QA fosse realizada utilizando os dez primeiros PCs (Figura 11).

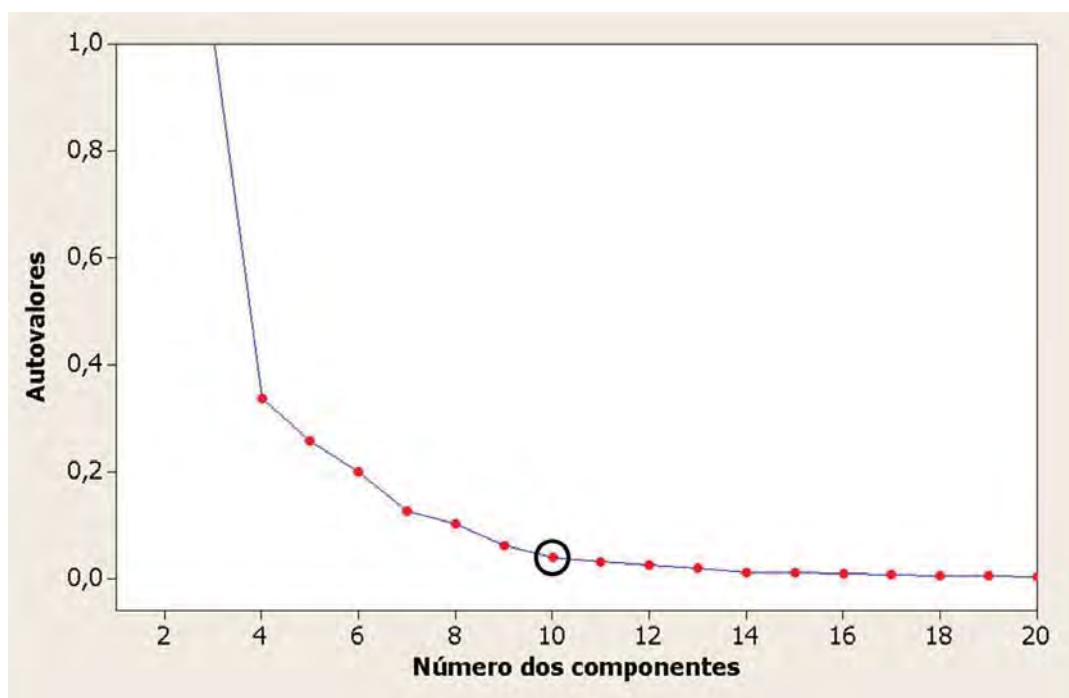


Figura 11 - Gráfico de *Scree Plot*. Relação entre os componentes principais e os autovalores, mostrando quais PCs devem ser utilizados para análise estatística. O PC10 ainda contribuiu para classificação dos espectros.

Para explicar bioquimicamente as diferenças encontradas tanto espectral quanto morfológicamente entre os dados de MN e QA, foram construídos gráficos de *Loading Plot* (Figuras 12 e 13). Analisando os gráficos de loading plot para as regiões de fingerprint e altos números de ondas, também ficou evidente que PC1-PC10 apresentaram informações relevantes para classificação das amostras, comprovando o critério estabelecido pelo gráfico de *Scree Plot* que considerou os dez primeiros PCs para utilização nas análises estatísticas.

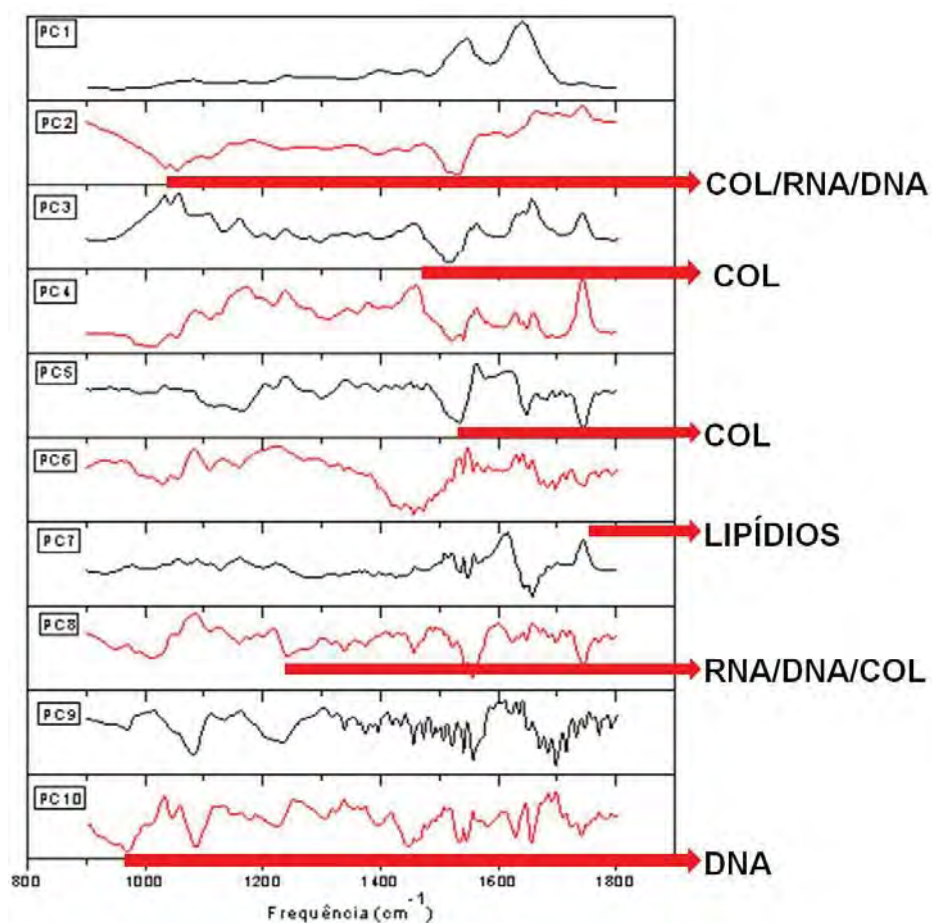


Figura 12 - Gráfico de *Loading Plot* da região de *fingerprint*. Observar a relação de intensidade positiva e negativa comparando-se ao PC1. Verificar que o PC10 também apresenta informações em algumas bandas que foram utilizadas para classificação dos espectros, confirmando o resultado mostrado no gráfico de *Scree Plot*.

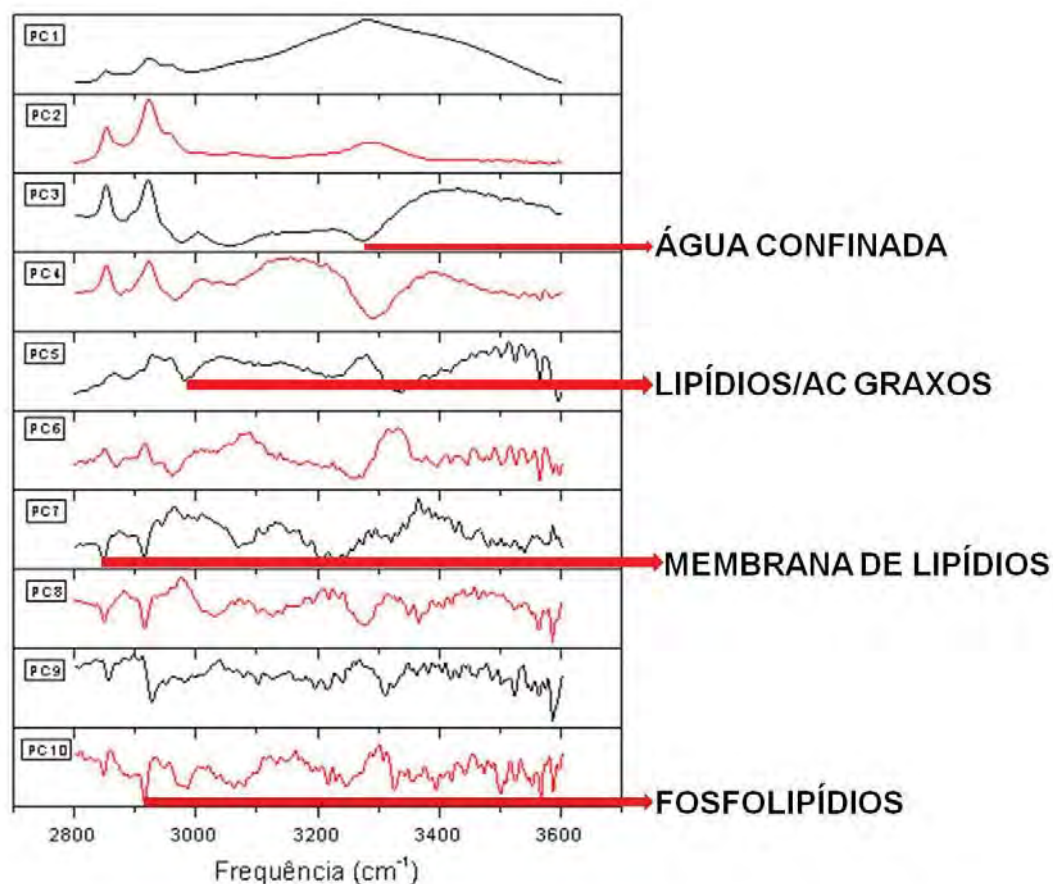


Figura 13 - Gráfico de *Loading Plot* da região de altos números de onda. Observar a relação de intensidade positiva e negativa comparando-se ao PC1. Verificar que o PC10 também apresenta informações em algumas bandas que foram utilizadas para classificação dos espectros, confirmando o resultado mostrado no gráfico de *Scree Plot*.

Observando os gráficos de *loading plot* tanto da região de *fingerprint* como da de altos números de onda ressalta-se que o PC1 representa o espectro médio das amostras, e os PCs subsequentes mostram as regiões espectrais as quais apresentaram maiores variações. Foram consideradas mais relevantes as regiões

que apresentaram diferenças de intensidade negativa ou positiva comparando-se ao PC1 (Figuras 12 e 13).

Desse modo, para a região de *fingerprint* as bandas que apresentaram uma maior diferença espectral relacionaram-se principalmente as vibrações C-C e C-H, nas quais observamos que o colágeno e os ácidos nucleicos (DNA e RNA) foram as estruturas que mais apresentaram contribuições para o diagnóstico (Quadro 2). A região espectral de altos números de ondas apresenta informações relacionadas principalmente a estruturas lipídicas, e variações de moléculas da água confinada presente nos tecidos. Assim, na análise dos *loading plots*, utilizando o mesmo critério de escolha citado anteriormente, as bandas com alterações dessas macromoléculas (água e lipídios) apresentaram maiores variações espectrais (Quadro 3).

Quadro 2 - Modos vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e QA para a região espectral de *fingerprint*. (Movasaghi et al., 2008).

BANDAS (cm ⁻¹)	MODOS VIBRACIONAIS	COMPONENTES ESTRUTURAIS
970	Estiramento diânionico do fosfato	DNA
1033/4	v (CC) esqueleto <i>cis</i>	Colágeno
1058/9	Estiramento C-OH	Oligossacarídeos
1084/5/6	vs (PO ₂ ⁻)	Ácidos nucleicos
1224	Estiramento ass (PO ₂ ⁻)	RNA/DNA/Colágeno
1458	Estiramento ass CH ₃	Colágeno
1514	v (C=C)	Estrutura carotenóide (pigmento celular)
1570	Amida II	Colágeno
1635	Estrutura <i>B-sheet</i> Amida I	Colágeno
1658	Estiramento C=O/Amida I	Colágeno
1743	Estiramento C=O	Lipídios

Quadro 3 - Modos vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e QA para a região de altos números de ondas. (Movasaghi et al., 2008).

BANDAS (cm ⁻¹)	MODOS VIBRACIONAIS	COMPONENTES ESTRUTURAIS
2853	v CH ₂	Membrana de lipídios
2915	v CH ₂ /CH ₃	Fosfolipídios
2973	v ass CH ₃	Lipídios/ácidos graxos
3330	Estiramento ass N-H	?
3396	Estiramento ass O-H	Água confinada

Utilizando o resultado da análise dos componentes principais (PCA), foi realizada análise de regressão logística binária como modelo para promoção de diagnóstico. Como citado anteriormente, os dez primeiros PCs foram utilizados nesta análise. Comparando-se 70 espectros de MN com 70 espectros de QA, referente aos 14 pacientes de cada grupo que participaram do estudo observou-se neste modelo de estudo 80,6 % de pares concordantes para a região de *fingerprint* e 81,7% para a região de altos números de onda.

Foi realizada a análise de regressão logística também utilizando-se um menor número de PCs (componentes principais), a qual mostrou que quanto menor for o número de PCs utilizados há uma diminuição nos pares concordantes (Figuras 14 e 15), confirmando mais uma vez a razão da utilização dos dez primeiros PCs no modelo de diagnóstico.

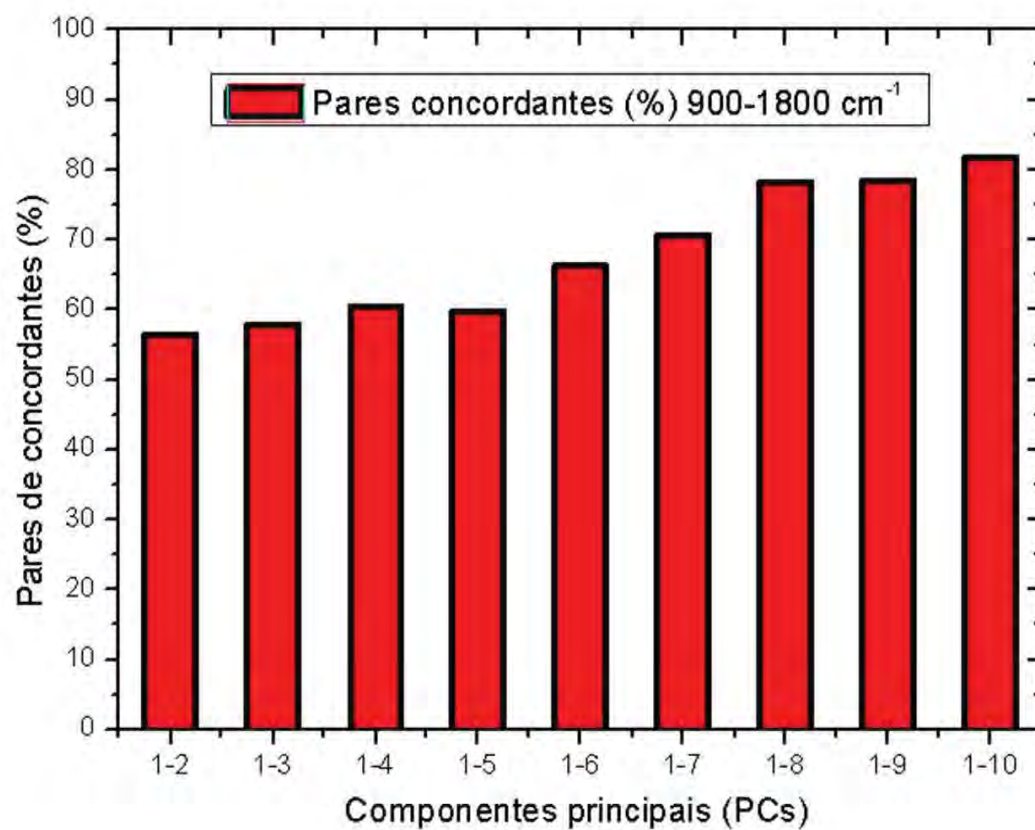


Figura 14 - Relação da porcentagem de pares concordantes e do número de PCs utilizados para análise de regressão logística binária na região de *fingerprint*. Notar que quanto menor for o número de PCs utilizados ocorre uma diminuição na porcentagem dos pares concordantes.

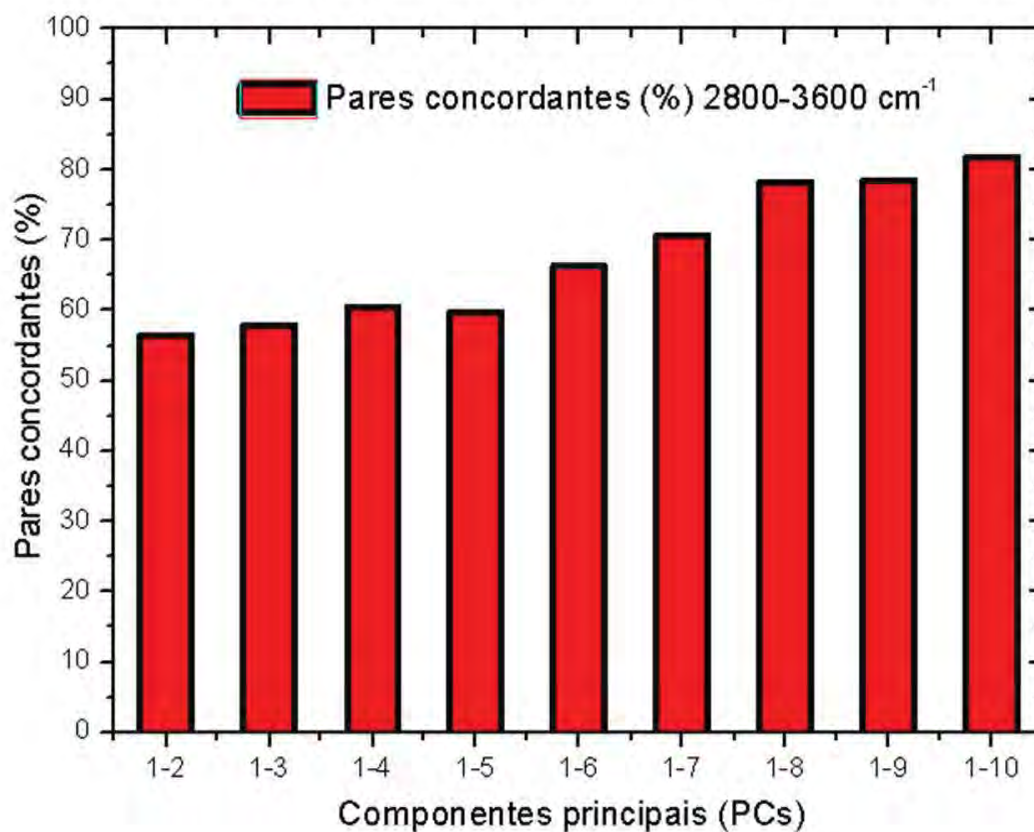


Figura 15 - Relação da porcentagem de pares concordantes e do número de PCs utilizados para análise de regressão logística binária na região de altos números de onda. Notar que quanto menor for o número de PCs utilizados ocorre uma diminuição na porcentagem dos pares concordantes.

Para avaliar a especificidade e a sensibilidade do modelo de diagnóstico foi realizada a curva ROC, que mostrou um valor preditivo do modelo correspondente à área sob a curva, sendo 0,79 para a região de altos números de onda e 0,74 para a região de *fingerprint* (Figura 16).

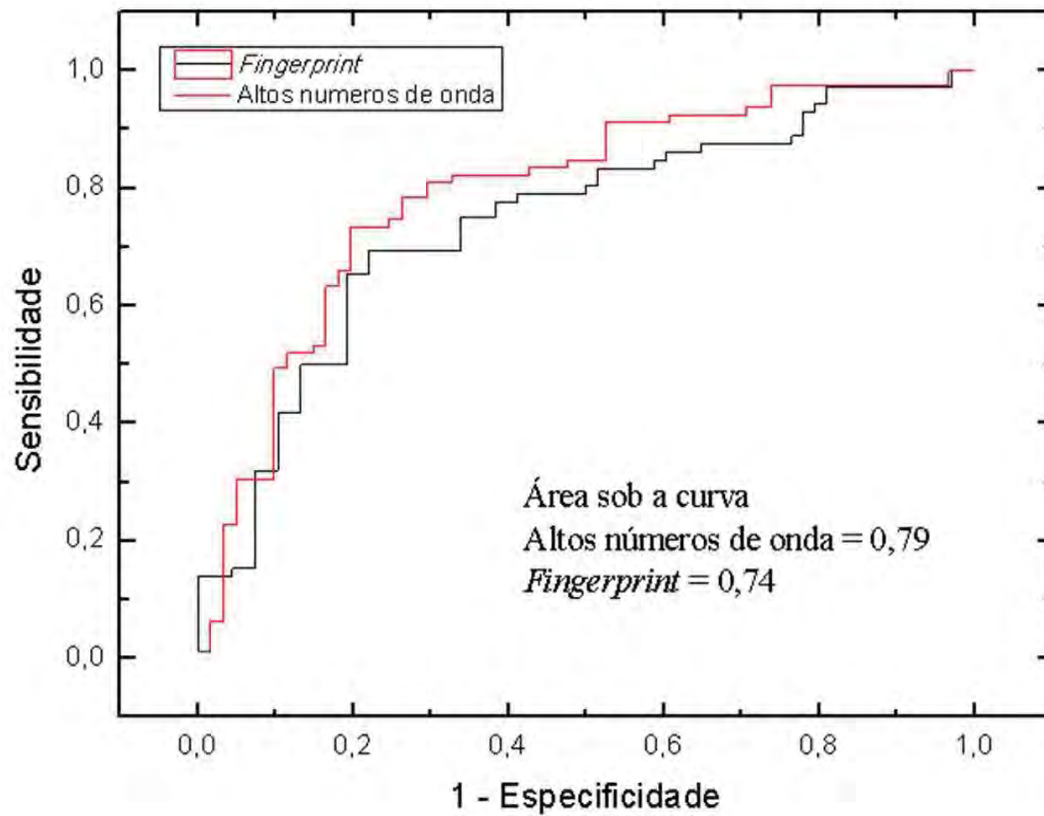


Figura 16 - Curva ROC. Observar a área sob a curva, mostrando que a região de altos números de onda apresenta um valor maior do que a região de *fingerprint*.

6 DISCUSSÃO

Atualmente muitos estudos no ramo da biópsia óptica têm sido realizados, principalmente com o objetivo da padronização das técnicas, para uma possível aplicação *in vivo*. Alguns autores já estão realizando alguns estudos *in vivo* com algumas técnicas como espectroscopia Raman e espectroscopia por reflectância (Kendall et al., 2010; Schwarz et al., 2009; Robichaux-Viehoever et al., 2007; Haka et al., 2006; Baker-Shut et al., 2000). Porém o presente estudo demonstrou que muito ainda tem que ser feito antes que possamos instituir o uso rotineiro da biópsia óptica, principalmente porque os autores tem se dedicado muito mais na análise de neoplasias malignas ao invés de pesquisarem com alterações com potencial de malignização, como a queilite actínica, e alterações de caráter inflamatório. Tais alterações, citadas em estudos prévios como sendo de difícil diagnóstico, podem interferir na interpretação de espectros normais ou malignos, apresentando resultados falsos-positivos ou falsos-negativos (Carvalho et al., 2010; Malini et al., 2006).

Outrossim, a eminente progressão das técnicas ópticas na prática clínica deve possibilitar informações mais detalhadas de lesões bucais, haja vista a espectroscopia micro FT-IR. Importante

que os estudos possibilitem a criação de um banco de dados espectrais das mesmas, contribuindo para o diagnóstico *in vivo* através destas técnicas.

A técnica de FT-IR é reconhecidamente útil para verificar alterações em nível molecular. As amostras de MN e QA exibiram diferentes vibrações, como estiramento, flexão, deformação ou combinações de vibrações, estas estão diretamente relacionadas com a estrutura molecular das biomoléculas constituintes (Lin et al., 2007), mostrando assim, informações úteis e complementares ao exame histopatológico. A queilite actínica é uma lesão potencialmente cancerizável (Cavalcante et al., 2008, Regezzi et al., 2000), podendo apresentar alterações nos ácido nucléicos, que estão diretamente envolvidas com o processo de síntese e multiplicação celular, e nas fibras colágenas. No presente estudo as principais alterações verificadas a partir da análise dos espectros envolveram principalmente a degeneração do colágeno, causado pela radiação ultra-violeta (UV) e variações nos ácidos nucléicos (DNA e RNA), que também podem estar associadas à radiação UV.

A associação da espectroscopia micro FT-IR com o acessório de ATR permitiram que a análise das amostras apresentasse algumas vantagens, como: pouco tempo para aquisição dos espectros, não ser destrutiva, alta relação sinal/ruído e alta resolução espacial (Lin et al., 2007). Além disso, foi possível a obtenção de vários pontos na mesma amostra; desse modo foram

obtidos 140 espectros no total, fazendo com que as amostras fossem avaliadas na maior área possível.

Foi observado através do PCA e dos gráficos de *loading plots* que as maiores variações espectrais entre as amostras de QA e MN na região de *fingerprint* estão relacionadas ao colágeno, ácidos nucleicos e lipídios. Do ponto de vista histopatológico, um dos indicadores para o diagnóstico de QA é a degeneração basofílica do colágeno que ocorre no tecido conjuntivo subjacente, causado principalmente pelo efeito da radiação UV.

Analizando a região de altos números de onda, fica evidente que os lipídios e a água confinada são as características mais importantes para que o diagnóstico entre as amostras seja observado. A variação encontrada nos lipídios e fosfolipídios (Hubner, Blume, 1998) pode estar relacionada a um início de degeneração que ocorre nas membranas plasmáticas das células, as quais apresentam essas macromoléculas em abundância, devido ao efeito crônico da radiação solar.

Alguns autores relatam que as moléculas de água podem agrupar-se forma diferente quando um processo patológico é evidenciado, como citado por Cibulsky et al., (2007). Desse modo, as moléculas de água estão sob diferentes formas em neoplasias malignas e tecidos normais. Gniadecka et al., (2003), também relata que a água pode comportar-se de modo diferente se for encontrada nos meios intra e extra celular. Carvalho, Sato et al., (2010)

analisando a região em altos números de onda, por espectroscopia Raman, também observou informações relevantes para o diagnóstico de lesões inflamatórias e mucosas normais, as quais também foram relacionadas com diferentes agrupamentos das vibrações OH. Assim, no presente estudo foi verificada uma variação na região espectral de 3396 cm^{-1} referente a água confinada. Uma provável degeneração tecidual que ocorre nas amostras de QA pode influenciar o agrupamento da água confinada nessas amostras.

Muitos autores relatam que a importância das técnicas consideradas como biópsia óptica (espectroscopias Raman, FT-IR, Fluorescência, UV-Vis, entre outras) deve-se principalmente a obtenção de um diagnóstico concreto através dos espectros, ou melhor, que as mesmas obtenham altos índices de sensibilidade e especificidade (Malini et al., 2006; Wang et al., 2003; Venkatakrishna et al., 2001). Porém, apesar dessa afirmação proceder e do presente estudo também obter um índice acima de 80% de sensibilidade e especificidade, é importante ressaltar ainda que as espectroscopias vibracionais (FT-IR e Raman) mostram informações relevantes para o entendimento do comportamento das macromoléculas em estados patológicos e fisiológicos, as quais não podem ser observadas somente pela análise morfológica, realizada através da histopatologia. Assim, no estágio atual, os diversos pesquisadores devem considerar tais técnicas como complementares

aos exames histopatológicos, imunoistoquímicos, imunofluorescentes, entre outros.

Comparando-se com outras técnicas convencionais, a espectroscopia vibracional oferece algumas vantagens: 1) requer mínima quantidade de amostra que pode ser analisada em diferentes formas e estados físicos, 2) não necessita qualquer procedimento prévio de preparação da amostra, tais como secagem ou colorações e 3) é uma técnica baseada em análise computadorizada dos espectros, podendo então ser automatizada (Conti et al., 2008). Algumas desvantagens relacionadas a esta técnica relacionam-se a amostra estar muito hidratada, o que pode ocasionar um déficit na obtenção do sinal de absorção no infravermelho, levando à obtenção de um espectro de baixa qualidade.

A técnica da Espectroscopia FT-IR utilizando as regiões de *fingerprint* e de alto número de onda possibilitou identificar em 80,6% e 81,7%, respectivamente, a relação que existe entre as amostras de QA e MN através da análise dos componentes principais (PCA) e da análise de regressão logística binária (Bewick et al., 2005; Dodd et al., 2003; Cohenford et al., 1997). Desse modo, indica que pode ser utilizada como exame complementar auxiliar do exame histopatológico, e como resultados preliminares, para serem utilizados no desenvolvimento de projetos para confecção de um equipamento que realize medidas *in vivo*.

Em um estudo comparativo entre a análise histopatológica e a espectroscopia FT-IR Petibois e Deleris (2006) avaliaram neoplasias cerebrais, e mostraram a importância da obtenção de novas ferramentas para diagnóstico complementares à histopatologia. Ressaltam em seu estudo que ainda que a histopatologia possa fornecer informações importante relacionadas aos aspectos morfológicos das lesões, com informações para classificação e estagiamento das mesmas, os neurocirurgiões não têm informações das neoplasias durante os procedimentos de ressecção cirúrgica, muito pelo tempo de processamento laboratorial necessário para obtenção do corte histológico. Assim, uma alternativa seria a utilização da técnica FT-IR na amostra *ex vivo*, sendo a grande aplicação desta técnica para diagnóstico imediato de algumas neoplasias cerebrais.

Em clínica estomatológica, durante a realização de uma biópsia incisional, um fragmento tecidual de aproximadamente 1cm^3 é utilizado para análise histopatológica, sendo geralmente suficiente para confirmação da hipótese diagnóstica, porém este tamanho pode variar dependendo do caso. Para análise espectroscópica, um fragmento com este tamanho, ou até menor poderá ser utilizado para obtenção dos espectros. O tempo necessário para aquisição dos espectros FT-IR é de aproximadamente 6 minutos como citado no presente estudo, e segundo alguns autores (Petibois, Deléris, 2006; Miller, Trall, 2004). Após a obtenção dos espectros

são necessários aproximadamente mais 10 minutos para tratamento dos dados (subtração da linha de base, normalização vetorial, análise dos componentes principais, análises dos espectros). Desse modo, para obtenção de um resultado molecular pela análise dos espectros, 15 a 20 minutos são necessários, ou seja, um tempo muito menor do que o processamento tecidual para análise microscópica através dos dados histopatológicos.

Com relação ao modelo de estudo para diagnóstico, observou-se que a utilização dos 10 primeiros PCs foi a que melhor representaria as variações entre as amostras de QA e MN. Como já citado anteriormente, realizando-se a RLB nos dados obtidos pela PCA, verificou-se que a região de fingerprint apresentou 80,6% dos pares concordantes e a região de altos números de onda apresentou 81,7% de pares concordantes.

A curva ROC mostrou um valor preditivo maior na região de altos números de onda (0,79) comparando-se com a região de fingerprint (0,74), demonstrando desse modo apresentar maior sensibilidade e especificidade para a região de altos números de onda. Apesar de tal região espectral ser pouco estudada, é importante ainda salientar que a mesma já foi citada em estudos prévios como tendo um poder discriminante maior do que a região de *fingerprint* (Carvalho, Sato et al., 2010). Assim, ressalta-se que os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar em futuros estudos *in vivo* envolvendo as técnicas de biópsia óptica.

7 CONCLUSÃO

Considerando as limitações do estudo, a espectroscopia micro FT-IR possibilitou avaliar importantes características moleculares das amostras de QA, evidenciadas tanto na região de *fingerprint* como na de altos números de onda, tais como: 1) alterações moleculares evidenciadas nas fibras colágenas, 2) variações nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), 3) degenerações evidenciadas em moléculas de lipídios e fosfolipídios e 4) variações encontradas na água confinada dos tecidos.

8 REFERÊNCIAS*

Amishi YS, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: a treatment review. *Int J Dermatol*. 2010;49:1225-34

Andrade PO, Bitar RA, Yassoyama K, Martinho H, Santo AM, Bruno PM, et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman Spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(5):1643-8.

Bagnato VS, Kurachi S, Castro-e-Silva O. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. *Acta Cirur Bras*. 2010;25(2):214-16.

Baker Shut TC, Witjes MJH, Sterenborg HJCM, Speelman OC, Roodenburg JLN, Marple ET et al. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 2000;72:6010-18.

Bewick V, Cheek L, Ball J, Statistics review 14: logistic regression, *Crit. Care* 2005; 9:112–8.

Bostrom MPG, Camacho NP, Bi X, Yang X. Fourier transform infrared imaging spectroscopy investigations in the pathogenesis and

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm.

repair of cartilage. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1758(7):934-41. Epub 2006 May 23.

Carvalho LFCS, Bitar RA, Arisawa EAL, Brandão AAH, Honório KM, Cabral LAG et al. Spectral region optimization for Raman-based optical biopsy of inflammatory lesions. *Photomed Las Surg*. 2010;28(1):111-7.

Carvalho LFCS, Sato ET, Almeida JD, Martinho HS. Diagnosis of inflammatory lesions by high-wave number Raman Spectroscopy. *SPEC. Shedding light on diseases*. 2010.

Cavalcanti AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 498–503.

Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microsc. Res Tech*. 2005; 68:75-9.

Cibulsky H, Sadlej J, On the calculations of the vibrational Raman spectra of small water clusters, *Chem Phys*. 2007;342:163–72.

Cohenford MA, Godwin TA, Cahn F, Bhandare P, Caputo TA, Rigas B. Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears: evaluation by principal component analysis. *Gynecol Oncol*. 1997;66:59-65.

Conti C, Ferraris P, Giorgini E, Rubini C, Sabbatini S, Tosi G, et al. Microimaging FTIR of head and neck tumours. *Microsc Res Tech*. 2009 Feb;72(2):67-75.

Conti C, Ferraris P, Giorgini E, Rubini C, Sabbatini S, Tosi G, et al. FT-IR microimaging spectroscopy: a comparison between healthy and neoplastic human colon tissues. *J Mol Struct*. 2008;881:46-51.

Dodd LE, Pepe MS, Partial AUC estimation and regression, *Biometr*. 2003;59:614–23.

Duperray A, Mantovani A, Introna M, Dejana E. Endothelial cell regulation of leukocyte infiltration in inflammatory tissues. *Mediat Infl*. 1995;4:322-30.

Firoozmand ML, Almeida JD, Cabral LAG. Study of denture-induced fibrous hyperplasia cases diagnosed from 1979 to 2001. *Quint Int*. 2005;38:41-5.

Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Cristensen DH, et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *J. Invest Dermatol*. 2004;122(2):443-9.

Gniadecka M, Nielsen O, Wulf, H. Water content and structure in malignant and benign skin tumours. *J Mol Struct*. 2003;661:405-10.

Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy . *Cancer Res.* 2006;66(6):3317-22.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med.* 2007;36:262-6.

Hubner W, Blume A. Interactions of the lipid-water interface. *Chem Phys Lipid.* 1998;96:99-123.

Jackson M, Sowa MG, Manstschr H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. *Biophys Biochem.* 1997;68:109-25.

Kendall C, Day J, Hutchings J, Smith B, Sheperd N, Barr H et al. Evaluation of Raman probe for oesophageal cancer diagnostics. *Analyst.* 2010;135:3038-41.

Kurachi C, Fontana CR, Rosa LE, Bagnato VS. Fluorescence spectroscopy for the detection of tongue carcinoma-validation in animal model. *J Biomed Opt.* 2008;13(3):034018.

Levine SM, Wetzel DL. Chemical analysis of multiple sclerosis lesions by FT-IR microspectroscopy. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jul 1;25(1):33-41.

Li Q, Sun X, Xu Y, Yang L, Zhang Y, Weng S et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for rapidly diagnose gastric endoscopic biopsies. *World J Gastroenterol.* 2005;11(25):3842-5.

Lin S, Li M, Cheng W. FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. *Spectrosc.* 2007;21:1-30.

Lyng FM, Faoláin EÓ, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, et al. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Exp Mol Path.* 2007;82:121-9.

Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam M, Utzinger U, Malpica A, Thomsen S, et al. Near-infrared spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photochem Photobio.* 1998;68(1):123-32.

Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study *Biopolymers.* 2006;81(3):179-93.

Martinho HS, Silva CMOM, Yassoyama MCBM, Andrade PO, Bitar RA, Santo AME et al. Role of cervicitis in the Raman-based optical diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *J Biomed Opt.* 2008; 13(5): 054029.

Miller JC, Thrall JH. Clinical molecular imaging. *J Am Coll Radiol.* 2004;1(1):4-23.

Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2008;43(2):134-79.

Naumann D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Appl Spectrosc Rev.* 2001;36(2:3):239-98.

Neville B, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. St. Louis: Saunders, Elsevier; 2009. 984p.

Nico MMS, Rivitti EA, Lourenço SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol* 2007;34:309–14.

Osada M, Gniadecka M, Wulf HC. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic analysis of proteins, water and lipids in intact normal stratum corneum and psoriasis scales *Exp. Dermatol.* 2004;13(6):391-5.

Penteado SCG, Fogazza BP, Carvalho CS, Arisawa EAL, Martins MA, Martin AA, et al. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier transform-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2008;13(1):1-10.

Petibois C, Deléris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Tren Biotechnol.* 2006;24(10):455-62.

Regezi JA, Sciubba JJ, Moleri AB, David FP, Moreira LC, Tavares RR. Patologia bucal: correlações clinicopatológicas. 3ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 475p.

Robichaux-Viehoever A, Kanter E, Shappell H, Billheimer D, Jones H 3rd, Mahadevan-Jansen A. Characterization of Raman spectra measured in vivo for detection of cervical dysplasia. Appl Spectrosc. 2007;61(9):986-93.

Sala O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho. São Paulo: Editora da UNESP; 1995. 224 p.

Schwarz RA, Gao W, Weber CR, Kurachi C, Lee JJ, El-Naggar AK et al. Noninvasive evaluation of oral lesions using depth-sensitive optical spectroscopy. Canc. 2009;115(8):1669-79.

Seguier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. J Periodontol. 2000;71(7):1079-85.

Tommasi AF. Diagnóstico em patologia bucal. 3ª ed. São Paulo: Pancast; 2002.

Venkatakrishna K, Kurien J, Kerrthilatha MP, Valiatan M, Kumar NN, Krishna CM et al. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. Current Sci. 2001;80(5):665-9.

Ulrich M, González S, Asschenfeldt-Lange B, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E et al. Non invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. *J Eur Academ Dermatol Venearol*. 2011;25:276-284.

Wang J, Shi J, Xu Y, Daun X, Zhang L, Wang J et al. FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophageous. *World J Gastroenterol*. 2003;9(9):1897-99.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

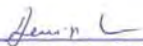
 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - M. São Dámas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / janete@focja.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 032/2010-PH/CEP, sobre
“**Análise ex vivo de lesões bucais por espectroscopia micro FT-IR**”,
sob a responsabilidade de **JANETE DIAS ALMEIDA**, tendo como
orientado o aluno **LUIS FELIPE DAS CHAGAS**, está de acordo com os
Princípios Éticos, seguindo diretrizes e Normas regulamentadoras de
pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do
Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em
Pesquisa.

São José dos Campos, 22 de junho de 2010.



Profa. Assist.Dra. DENISE NICODEMO
Vice-Coordenadora

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro (a) Senhor (a)

Eu Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho, portador de RG 33450759-5, aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, sob orientação da Professora Doutora Janete Dias Almeida, vou desenvolver uma pesquisa cujo título é “Análise *ex vivo* de lesões bucais por Espectroscopia FT-IR”.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficiência do uso da Espectroscopia FT-IR, um método diagnóstico não invasivo, que permite caracterizar a amostra quanto aos constituintes básicos teciduais e as ligações químicas presentes nesses tecidos. A espectroscopia FT-IR é também chamada de biópsia óptica por permitir a análise da emissão de uma luz laser sobre o tecido retirado. Até o presente momento não é possível a análise *in vivo*, ou seja, diretamente no paciente, pois o equipamento para realização local ainda não está disponível. A análise é conhecida como *ex vivo*, isto é, fragmento de tecido retirado para diagnóstico.

As amostras serão transportadas até o laboratório do Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC em Santo André, São Paulo. O transporte será realizado em galões próprios para o transporte em nitrogênio líquido, evitando o descongelamento e a

possível degradação das amostras, antes da análise. Tal análise será realizada sob orientação do professor Herculano da Silva Martinho do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC.

Tendo V. Sa. sido submetido à biópsia de lesão bucal, solicito vossa autorização para retirar um fragmento do tecido que será enviado para análise laboratorial, o qual consiste em cerca de 2mm. A amostra a ser analisada será imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. V As. estará contribuindo para a pesquisa que no futuro espera-se estar acessível in vivo.

Informo que o Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, situada na Av. Eng. Francisco José Longo, 777, CEP 12245-000, em São José dos Campos – SP, fone/fax: (12) 3947-9078, e-mail janete@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Profa. Dra. Janete Dias Almeida. Garantimos que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar.

Não existirão despesas, compensações pessoais ou financeiras para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação.

Anexo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso aceite participar da pesquisa e não tenha qualquer dúvida.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos esclarecimentos que li ou que foram lidos para mim, descrevendo o estudo “Análise ex vivo de lesões bucais por Espectroscopia FT-IR”.

Eu discuti com o aluno Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer momento. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante

Nome:

RG:

_____ Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho

Data ____/____/____