Universidade do Vale do Paraíba Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

MÁRIO AUGUSTO DA SILVA MARTINS

ESPECTROSCOPIA RAMAN DIFERENCIAL

São José dos Campos, SP 2008 Mário Augusto da Silva Martins

"Espectroscopia Raman Diferencial"

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho Co-Orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin

São José dos Campos, SP 2008

M344	4e
	Martins, Mário Augusto da Silva Espectroscopia Raman diferencial./ Mário Augusto da Silva Martins.Orientador: prof. Dr. Herculano da Silva Martinho. São José dos Campos, 2008. 1 Disco laser: Color
	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008
	1 Raman, Espectroscopia 2. Fluorescência 3. Física I. Martinho, Herculano da Silva , Orient., II. Título.
	CDU:543.42

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno: Mario Cuagento da Silva Martino

Data: 13 de março de 2008.

MÁRIO AUGUSTO DA SILVA MARTINS

"ESPECTROSCOPIA RAMAN DIFERENCIAL"

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Física e Astronomia, do Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. AIRTON ABRAHÃO MARTIN (UNIVAP) Prof. Dr. HERCULANO DA SILVA MARTINHO (UNIVAP) Prof. Dra. ADRIANA FONTES (UFPE) Adriana Fontes

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco Diretor do IP&D – UniVap São José dos Campos, 29 de fevereiro de 2008. Dedico este trabalho a todos que me acompanharam em todas as vitórias e derrotas na luta diária, sem elas eu não teria crescido, e que acreditaram e me fizeram alcançar resultados promissores, os quais abrem novas portas para futuras novas pesquisas e vitórias. **Agradeço** primeiramente a Deus, meus pais e familiares que estiveram sempre juntos nesta jornada, me fazendo acreditar e alcançar meus objetivos.

Agradeço também as agências financiadoras dos projetos: CNPq (401018/2005-9) e FAPESP (2001/14384-8), assim como a CAPES pela bolsa de estudo concedida; que forneceram apoio e suporte para a realização do mesmo.

Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles (amigos, alunos, professores e funcionários), que de uma forma direta ou indireta, também contribuíram para a realização deste trabalho. Um especial agradecimento aos orientadores e a todos os colaboradores do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica – LEVB, que ao longo desta jornada, me forneceram novos conhecimentos que, me deram suporte para todas as minhas conquistas e que certamente serão utilizados em futuros novos projetos em minha vida.

Á todos, meus sinceros muito obrigado.

"Não se pode ensinar coisa alguma a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo".

Galileu Galilei (1564 - 1642)

ESPECTROSCOPIA RAMAN DIFERENCIAL

RESUMO

A maior vantagem da técnica de espectroscopia Raman comparada com as outras técnicas de análise é o fato da mesma promover investigações bioquímicas em diferentes tipos de materiais. Particularmente, esta técnica de análise tem um grande interesse no setor biomédico por ser uma importante ferramenta analítica de pesquisa. Porém, amostras biológicas são espécimes muito fluorescentes, podendo ter seus espectros Raman mascarados, tornando-se impossível o processo de identificação dos mesmos. Este trabalho apresenta um método para a redução ou eliminação dos efeitos da fluorescência sobre os espectros Raman de amostras biológicas. Este método baseia-se em recuperar as bandas Raman usando a Espectroscopia Raman Diferencial. Os espectros diferenciais são gerados através da subtração de dois espectros similares de uma amostra biológica, obtidos através de um pequeno deslocamento na linha do laser de excitação (SERDS), onde cada espectro é capturado usando linhas do laser de excitação muito próximas. A primeira linha do laser é centralizada em um comprimento de onda definido (1) e a segunda é deslocada por um pequeno valor conhecido (ΔI). Foram desenvolvidos dois diferentes tipos de sistemas ópticos, cada um com diferentes finalidades. O primeiro deles é usado no estudo de amostras biológicas "In Vitro" e o segundo é usado no estudo de amostras biológicas "In Vivo". Os resultados indicam um grande avanço nesta área de pesquisa. Fato este que pode ser comprovado, comparando-se o espectro final obtido de um sistema Raman Diferencial com um espectro final obtido de um sistema FT-Raman, em análises idênticas. Com a finalidade de se mostrar as diferenças entre os dois sistemas, serão realizadas comparações entre alguns parâmetros de ambos sistemas, indicando as principais vantagens em que o sistema Raman Diferencial tem sobre o sistema FT-Raman, como por exemplo: menor tempo para aquisição de espectros; possibilidade de mudança da fonte excitadora (laser), sem que haja significativas mudanças no circuito óptico; possibilidade de redução de escala do circuito óptico; baixo custo; entre outros.

Palavras Chave: Espectroscopia Raman Dispersiva; SERDS; Fluorescência.

DIFFERENTIAL RAMAN SPECTROSCOPY

ABSTRACT

The most advantage of Raman spectroscopy technique compared with others analysis techniques, is the fact that it promotes a biochemical investigation in different kinds of materials. Particularly, this technique has a great interest in the biomedical field because it becomes an important analytical research tool. However, biological samples are very fluorescents specimens and this should mask its Raman spectrum, making impossible to identify them. This work shows a method to reduce or eliminate de luminescence effect on Raman spectra of biological samples. This method is based on recovering Raman bands using Differential Raman Spectroscopy. The differential spectrum is generated by the subtraction of two similar spectra from a biological sample, obtained by a small shift on the excitation laser line (SERDS), where each spectrum is captured using too close excitation laser lines. The first laser line is centred with a defined wavelength (1) and the second one is slightly shifted by a known value (ΔI). It was developed two different kinds of dispersive optical systems, each one with different uses form. The first one is used to study "In Vitro" biological samples and the second one is used to study "In Vivo" biological samples. The results indicate a great advance in this research area. This fact may be demonstrated comparing a final spectrum obtained from a Differential Raman system with a final spectrum from a FT-Raman system, in identical analysis. With the purpose to show the differences between the two systems, some parameters of both systems will be compared, indicating the main Differential Raman system advantages over the FT-Raman system, like: less time for acquisition of the spectra; possibility of changing the laser source, without any optical circuit significant changes; optical circuit reducing scale possibility; low cost; etc.

Key Words: Dispersive Raman Spectroscopy; SERDS; Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: NÍVEIS DE ENERGIA DE UMA MOLÉCULA: ROTACIONAL (J), VIBRACIONAL (V) E ELETRÔNICO (ALGARISMOS ROMANOS). AS SETAS INDICAM AS POSSÍVEIS TRANSIÇÕES: (A) ROTACIONAL, (B) ROTACIONAL-VIBRACIONAL E (C) ELETRÔNICA	22
FIGURA 2: ESPALHAMENTO ELÁSTICO RAYLEIGH	25
FIGURA 3: ESPALHAMENTOS INELÁSTICOS: (A) ESPALHAMENTO STOKES; (E ESPALHAMENTO ANTI-STOKES	3) 26
FIGURA 4: RELAÇÃO ENTRE OS ESPALHAMENTOS.	26
FIGURA 5: INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA PARA MEDIDAS RAMAN	27
FIGURA 6: TRANSIÇÕES DOS ESPALHAMENTOS (ELÁSTICO/INELÁSTICO) E DA FLUORESCÊNCIA ENTRE OS ESTADOS DE ATÔMICOS DE ENERGIA.2	29
FIGURA 7: ESPECTRO RAMAN COM FLUORESCÊNCIA. AS SETAS INDICAM A PRINCIPAIS BANDAS RAMAN DO SINAL, SENDO MASCARADAS PELA FLUORESCÊNCIA	S 30
FIGURA 8: ETALONING: A) DEVIDO AO FILTRO NOTCH DO SISTEMA; B) DEVIDO AO CCD DO SIS TEMA.	33
FIGURA 9: RAIOS CÓSMICOS ADICIONADO AO ESPECTRO RAMAN	34
FIGURA 10: MÓDULO DE CORRENTE / CABEÇA DO LASER	35
FIGURA 11: "CABEÇA" DO LASER: DIODO LASER + CAVIDADE EXTERNA	36
FIGURA 12: FILTRO PASSA-ALTA LP02-785RU-25.	38
FIGURA 13: FILTRO PASSA-ALTALP02-830RU-25.	38
FIGURA 14: FILTRO NOTCH NF01-785U-25.	39
FIGURA 15: FILTRO NOTCH NF01-830U-25.	39
FIGURA 16: ESPELHOS REDONDOS 10CM00SB.2 (BROADBAND SUPER MIRRORS), PARA O IR PRÓXIMO	40
FIGURA 17: FILMES DOS ESPELHOS (BROADBAND SUPER MIRRORS). ATUAÇÃO: (A) EM 0 ⁰ ; (B) EM 45 ⁰	41
FIGURA 18: PROPRIEDADES DAS LENTES (FORMAÇÃO DE IMAGEM)	41

FIGURA 19: LENTES PLANO-CONVEXAS (BK7-AR.16)43
FIGURA 20: LENTES BI-CONVEXAS (BK7-AR.16)44
FIGURA 21: ESPECTRÔMETRO SPECTRAPRO-2500I (PIACTON)45
FIGURA 22: CONFIGURAÇÃO CZERNY-TURNER (ESPECTRÔMETRO)46
FIGURA 23: GRADE DE DIFRAÇÃO46
FIGURA 24: PORTA-AMOSTRAS: A) SISTEMA IN VITRO E B) SISTEMA IN VIVO. NOS DETALHES OS AMBIENTES DE FIXAÇÃO DAS AMOSTRAS48
FIGURA 25: CATETER (785 NM): SISTEMA IN VIVO. NOS DETALHES: A) PORÇÃO DE EXCITAÇÃO, B) PORÇÃO DISTAL E C) PORÇÃO PROXIMAL. 49
FIGURA 26: CONSTRUÇÃO E SUBDIVISÕES DO CATETER50
FIGURA 27: AMOSTRAS (IN VITRO): DISCOS DE DENTES HUMANOS. NOS DETALHES (SETAS), A LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES ESTUDADAS50
FIGURA 28: AMOSTRAS (IN VIVO): DEDO HUMANO E MAMA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY. NOS DETALHES (SETAS), A LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES ESTUDADAS51
FIGURA 29: METODOLOGIA DA ESPECTROSCOPIA DIFERENCIAL RAMAN. NOS DETALHES: A) DESLOCAMENTO PEQUENO E B) DESLOCAMENTO MUITO GRANDE
FIGURA 30: DIAGRAMA (LASER 785 NM): CORRENTE DE ALIMENTAÇÃO X POTÊNCIA DE SAÍDA
FIGURA 31: DIAGRAMA (LASER 830 NM): CORRENTE DE ALIMENTAÇÃO X POTÊNCIA DE SAÍDA
FIGURA 32: TRANSLADOR DE COMPRIMENTO DE ONDA (LASER 830 NM). NO DETALHE O ACOPLAMENTO ENTRE O DISPOSITIVO TRANSLADOR E A "CABEÇA" DO LASER
FIGURA 33: TESTE DE DESLOCAMENTO DO DISPOSITIVO TRANSLADOR (LASER 830 NM)
FIGURA 34: PROBLEMAS COM O ACOPLAMENTO MECÂNICO ENTRE O DISPOSITIVO TRANSLADOR DE COMPRIMENTO DE ONDA E O LASER 785 NM
FIGURA 35: MONTAGEM ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DIFERENCIAL RAMAN (IN VITRO): (1) LASER DE EXCITAÇÃO; (2) ESPELHO AJUSTÁVEL; (3) LENTE CONVERGENTE (FOCALIZADORA); (4) PORTA-AMOSTRAS; (5) E (7) SISTEMA DE TELESCÓPIO; (6) FILTRO NOTCH (1 = 830NM); (8) ESPECTRÔMETRO; (9) CÂMERA CCD; (10) COMPUTADOR64

FIGURA 36: MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DIFERENCIAL RAMAN (IN VITRO). NO DETALHE A MONTAGEM DO DISPOSITIVO RESPONSÁVEL PELA VARIAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DO LASER DE EXCITAÇÃO
FIGURA 37: MONTAGEM DO TELESCÓPIO65
FIGURA 38: MONTAGEM ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DIFERENCIAL RAMAN (IN VIVO): (1) LASER DE EXCITAÇÃO; (2) CATETER (PORÇÃO DE EXCITAÇÃO); (3) CATETER (PORÇÃO DISTAL); (4) PORTA-AMOSTRAS; (5) CATETER (PORÇÃO PROXIMAL); (6) ESPECTRÔMETRO; (7) CÂMERA CCD; (8) COMPUTADOR
FIGURA 39: MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DIFERENCIAL RAMAN (IN VIVO). NO DETALHE SUPERIOR ESQUERDO, A PORÇÃO DISTAL DO CATETER; NO DETALHE INFERIOR DIREITO, A PORÇÃO DE EXCITAÇÃO DO CATETER; NA INDICAÇÃO CENTRAL, A PORÇÃO PROXIMAL DO CATETER, A QUAL DEVERÁ SER ACOPLADA A ENTRADA DO ESPECTRÔMETRO
FIGURA 40: SISTEMA FT-RAMAN (RFS 100/S) DO LABORATÓRIO DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL BIOMÉDICA, DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FIGURA 41: ESPECTRO RAMAN DE UM DENTE HUMANO: A) GRADE DE 300 GR./MM; B) GRADE DE 600 GR./MM E C) GRADE DE 1200 GR./MM. TODAS EM RELAÇÃO A DIFERENTES POTÊNCIAS DO LASER
FIGURA 42: ESPECTROS DE UM DENTE HUMANO: INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES VALORES 1 EM DIFERENTES POTÊNCIAS DO LASER DE EXCITAÇÃO, PARA CADA UMA DAS GRADES UTIL IZADAS70
FIGURA 43: SUBTRAÇÃO DOS ESPECTROS. DETERMINAÇÃO DO MELHOR VALOR DE (ΔI)
FIGURA 44: ESPECTRO DO CORPO NEGRO: MONTAGEM EXPERIMENTAL. NO DETALHE, A FONTE DE ALIMENTAÇÃO DA LÂMPADA. A SETA INDICA O ACOPLAMENTO DA "ESFERA INTEGRADORA" COM O ESPECTRÔMETRO.
FIGURA 45: ESPECTROS DO CORPO NEGRO (VALORES MEDIDOS / VALORES TEÓRICOS)
FIGURA 46: INVESTIGAÇÃO DOS PARÂMETROS $M^{-1}(1)$ PARA CADA GRADE.
FIGURA 47: ESPECTRO FINAL <i>R</i> (<i>I</i>) : COLUNAS: GRADES DE 300, 600 E 1200 GR./MM, RESPECTIVAMENTE. LINHAS: DE (A) À (D); DE (E) À (H) E DE (I) À (L), VARIAÇÃO DE POTÊNCIA DO LASER (15, 45, 80 E 110 MW, RESPECTIVAMENTE)

FIGURA 48: ESPECTRO DIFERENCIAL RAMAN: DENTE HUMANO. ETAPAS: A) AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS; B) SUBTRAÇÃO DOS ESPECTROS; E C) INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO SUBTRAÍDO E RESULTADO FINAL. AINDA EM (C), COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE O D SISTEMA IN VITRO E DO SISTEMA FT-RAMAN	C
FIGURA 49: ESPECTRO DIFERENCIAL RAMAN: DEDO HUMANO (PELE). ETAPAS: A) AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS; B) SUBTRAÇÃO DOS ESPECTROS; E C) INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO SUBTRAÍDO E RESULTADO FINAL. AINDA EM (C), COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE O D SISTEMA IN VIVO E DO SISTEMA FT-RAMAN	2
FIGURA 50: ESPECTRO DIFERENCIAL RAMAN: MAMA (PELE) DE UMA RATA DE LABORATÓRIO SPRAGUE-DAWLEY. ETAPAS: A) AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS; B) SUBTRAÇÃO DOS ESPECTROS; E C) INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO SUBTRAÍDO E RESULTADO FINAL. AINDA EM (C), COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE O D SISTEMA IN VNO E DO SISTEMA FT-RAMAN	3

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PARÂMETROS DAS LENTES PLANO-CONVEXAS. FONTE: NEWPORT (2006)	.43
TABELA 2: PARÂMETROS DAS LENTES BI-CONVEXAS. FONTE: NEWPORT (2006)	.44
TABELA 3: RELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE ALIMENTAÇÃO POR POTÊNCIA DE SAÍDA DOS LASERS	.56
TABELA 4: VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS DA CORRENTE DE ALIMENTAÇÃ DOS LASERS	0 .58
TABELA 5: TESTE DE CALIBRAÇÃO DO DISPOSITIVO TRANSLADOR (LASER 830 NM)	.60
TABELA 6: DESLOCAMENTOS APLICADOS AO LASER DE 785 NM	.62
TABELA 7: PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DAS GRADES DE 300, 600 I 1200 GR./MM	E .77

LISTA DE SIGLAS

CCD	 (Charge Coupled Device) – detector de cargas acopladas;
FT-Raman	 Sistema Raman com Transformadas de Fourier;
EWHN	_ (Full Width at Half maximum) - largura da curva na metade de
	seu ponto de máximo valor;
HAP	= Hidoxiapatita;
IR	 (Infra Red) – radiação infravermelha;
LED	 Light Emitting Diode) – diodo emissor de luz;
Macro-Raman	 Sistema Raman para amostras de ordem macroscópica;
	(Neodymium- doped Yttrium Aluminium Garnet) – laser (1064
$NU \cdot V \Delta(\cdot)$	
Nd:YAG	= nm);
Nd:YAG OD	 nm); = (Optical Density) – densidade óptica;
Nd:YAG OD RMS	 nm); (Optical Density) – densidade óptica; (Root Mean Square) – valor de potência nominal;
Nd:YAG OD RMS S/R	 nm); (Optical Density) – densidade óptica; (Root Mean Square) – valor de potência nominal; (Signal to Noise ratio) – relação sinal – ruído;
Nd:YAG OD RMS S/R SERDS	 nm); (Optical Density) – densidade óptica; (Root Mean Square) – valor de potência nominal; (Signal to Noise ratio) – relação sinal – ruído; (Shifted Excitation Difference Spectroscopy) – Espectroscopia
Nd:YAG OD RMS S/R SERDS	 nm); (Optical Density) – densidade óptica; (Root Mean Square) – valor de potência nominal; (Signal to Noise ratio) – relação sinal – ruído; (Shifted Excitation Difference Spectroscopy) – Espectroscopia Diferencial Raman por Excitação Deslocada;

LISTA DE SÍMBOLOS

1	= Comprimento de onda;
ΔI	 Deslocamento do comprimento de onda;
$\Delta \Phi$	 Variação no ângulo da grade de difração;
L(1)	 Sinal interferente de luminescência (fluorescência);
$M(\boldsymbol{l})$	 Resposta óptica do sistema (grade de difração);
<i>B</i> (<i>1</i>)	= (Background noise) - ruído de fundo do sistema óptico;
$S_R(\boldsymbol{l})$	 Espectro Raman (com sinais interferentes);
dS(l)	 Espectro Raman subtraído;
R(1)	 Espectro diferencial Raman final;
h	= Constante de Planck = $6,6260755 \times 10^{-34}$ (J.s);
с	 Velocidade da luz no vácuo = 2,998x10⁸ (m/s);
K _B	= Constante do Boltzmann = $1,381 \times 10^{-23}$ (J/K).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR	21
2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN	23
2.2 EST ECTROSCOTTA RAMAN	, <u>2</u> 3 23
2.2.2 INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA PARA MEDIDAS RAMAN	23
2 2 EATODES DE INTEDEEDÊNCIA QUE MASCADAM O ESDECTDO DAN	TANI 90
2.3 FATORES DE INTERFERENCIA QUE MASCARAM O ESPECTRO RAM 2.3.1 LUMINESCÊNCIA (ELUODESCÊNCIA / EOSEODESCÊNCIA)	1AIN .20 28
2.3.1 LUMINESCENCIA (FLUORESCENCIA / FOSFORESCENCIA)	20 21
2.3.2 ETALONINO 2.3.3 PAIOS CÓSMICOS	22 22
2.5.5 KAIOS COSMICOS	
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 DESCRIÇÃO DETALHADA DOS EQUIPAMENTOS ÓPTICOS UTILIZAJ	DOS.35
3.1.1 O LASER	35
3.1.2 FILTROS ÓPTICOS	37
3.1.2.1 FILTROS PASSA-ALTA	
3.1.2.2 FILTROS NOTCH	39
3.1.3 ESPELHOS	40
3.1.4 LENTES:	41
3.1.5 ESPECTRÔMETRO + DETECTOR (CCD)	44
3.1.6 OS PORTA-AMOSTRAS	47
3.1.7 O CATETER (FIBRA ÓPTICA)	48
3.2 AS AMOSTRAS	50
	51
3.3 SOFTWARES UTILIZADOS	
3.4 METODOLOGIA DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DIFERENCIAL	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 MONTAGEM EXPERIMENTAL	56
4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LASERS	56
4.1.1.1 TRANSLADORES DE COMPRIMENTO DE ONDA DO LASER	59
4.1.2 SISTEMAS OPTICOS IMPLEMENTADOS	62

4.1.2.1 SISTEMA MACRO-RAMAN IN VITRO 4.1.2.1.1 O TELESCÓPIO 4.1.2.2 SISTEMA MACRO-RAMAN IN VIVO	63 64 66
4.2 EXPERIMENTOS COM O SISTEMA ÓPTICO IN VITRO	67
4.3 EXPERIMENTOS COM O SISTEMA ÓPTICO IN VIVO	81
5 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1 INTRODUÇÃO

A evolução tecnológica ocorrida nestas últimas décadas tem contribuído para consideráveis avanços em pesquisas e estudos nas mais diversas áreas. A biofotônica é uma dessas áreas. Dentro desta, destaca-se a técnica de espectroscopia Raman, devido a sua aplicabilidade e potencialidade de uso. Ela é uma técnica utilizada para caracterização bio-fisico-química de diferentes tipos de materiais.

Para sistemas biológicos em particular, a técnica de espectroscopia Raman tem se mostrado como uma ferramenta extremamente promissora por não ser invasiva e não ser destrutiva, ou seja, não havendo a necessidade de remoção da amostra da região em análise, garantindo sua integridade física durante todo o processo de análise da mesma. Podendo-se então, reutilizar a mesma amostra em outras futuras análises. Proporciona-se assim, cada vez mais novos estudos e análises *In Vivo / In Vitro* de amostras biológicas, destacando-se nos campos de diagnóstico de neoplasias em tecidos biológicos (O´SHEA et al., 1974; BITAR et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; MARTIN et. al. 2004; NUNES et. al., 2003; PENTEADO et. al., 2006; MARZULLO et. al., 2007); odontologia (CARDEN et al., 2000; OLIVEIRA et. al., 2006; SOARES et al., 2007a); e estudos celulares (XIE; LI, 2003; TANG et al., 2005; XIE et al., 2005; RAMSER et al., 2005; OJEDA et al., 2006).

A tecnologia disponível atualmente para instrumentação espectroscópica (fotodetectores, grades de difração, lasers, lentes, filtros, etc.), possui melhor performance, na região visível do espectro (400 – 750 nm). Porém, para estudos em sistemas biológicos, o uso de luz com este comprimento de onda (*I*), induz fluorescência, o que pode mascarar a maioria das bandas (picos) do sinal Raman e diminuir a relação sinal ruído (S/R) das medidas realizadas.

Para superar este problema, uma possibilidade seria a de utilizar radiação infravermelha (IR), especialmente Nd:YAG, em 1064 nm (ANDRADE et al., 2007). Espectros razoáveis com esta excitação são obtidos através da técnica FT-Raman, porém a mesma demanda longos tempos de aquisição (tipicamente 1000 vezes a mais que na técnica Raman dispersiva), com baixa resolução e sensibilidade. Além

do mais, excitação com (1) muito grande diminui ainda mais o sinal Raman espalhado pela amostra, tornando-se mais difícil a sua análise.

Outra opção é a de utilizar radiação ultravioleta (UV), com a qual é possível obter espectros de boa qualidade, devido à eliminação dos efeitos da fluorescência, assim, como pela intensificação das bandas Raman (aproximadamente $1/I^4$). Entretanto, a instrumentação necessária é limitada e demanda um alto custo. Além de que, as amostras biológicas podem sofrer sérios danos, devido à incidência de radiação UV. Para sistemas *In Vivo*, existe uma limitação do uso de cateteres de fibra óptica devido a grande perda do sinal na fibra operando na região do UV.

Recentemente, alguns métodos foram desenvolvidos, objetivando a redução ou até a eliminação por completo dos efeitos de fluorescência do sinal Raman espalhado pela amostra (BELL; BOURGUIGNON; DENNIS, 1998; BARSBERG; MATOUSEK; TOWRIE, 2005; OSHIMA et. al., 2006). Entre eles destacam-se: o método SERDS (Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy), ou ainda, Espectroscopia Diferencial Raman por Excitação Deslocada (TRACEWELL et al., 2001; MATOUSEK; TOWRIE; PARKER, 2002); o método de modulação de polarização (PERSON; ZHAO; ZHANG, 2006); por fim, o método de excitação por pulso de pico-segundos (EFREMOV et. al., 2007). Neste trabalho apresentaremos o desenvolvimento de uma variante destes métodos, chamado de Espectroscopia Raman Diferencial, aplicável a sistemas biológicos *In Vitro* e *In Vivo*.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é implementar a técnica de Espectroscopia Raman Diferencial que seja capaz de fornecer espectros Raman totalmente livres de fluorescência para estudos em sistemas biológicos "*In Vitro*" e "*In Vivo*".

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

O termo espectroscopia refere-se ao conjunto de métodos e técnicas, baseados na interpretação dos espectros de emissão, absorção, e/ou espalhamento de radiações eletromagnéticas de uma dada amostra. Estes métodos oferecem uma grande contribuição aos estudos das estruturas e propriedades da matéria, nos mais diferentes setores como: física atômica e molecular, química e biologia molecular. Os espectros de emissão e/ou absorção, revelam informações tanto estruturais, como também, de interações intramoleculares da matéria através da interação da radiação com os átomos e/ou moléculas da mesma (DEMTRÖDER, 1996).

Os espectros são obtidos através das transições entre os estados (níveis) de energia das moléculas de uma determinada substância. A espectroscopia molecular estuda a variação interna de energia de uma molécula durante seu processo de absorção, emissão ou espalhamento de quantidades discretas (quantizadas) de radiação eletromagnética (HECHT, 2002).

A energia total de uma molécula pode ser expressa através da soma das energias de excitações parciais dos níveis eletrônico, vibracional e rotacional da mesma (SALA, 1996; EISBERG; RESNICK, 1979), conforme mostra a equação (1):

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$$
 [1]

Espectros Rotacionais: resultam das transições entre os níveis rotacionais de um determinado nível vibracional em um estado eletrônico particular. Geralmente, estes espectros estão nas regiões de microondas e/ou no infravermelho distante. Estes espectros podem ser analisados por meio da espectroscopia Raman.

Espectros Rotacionais - Vibracionais: resultam de transições dos níveis rotacionais de um determinado estado vibracional, para os níveis rotacionais de um outro determinado estado vibracional, dentro de um mesmo estado eletrônico (estado eletrônico permanece inalterado). Geralmente, estes espectros localizam-se

na região do infravermelho, onde são compostos por linhas estreitamente espaçadas, denominadas linhas de banda. Estes espectros podem ser analisados por meio da espectroscopia Raman e pela espectroscopia infravermelha.

Espectros Eletrônicos: resultam de transições que ocorrem entre os níveis rotacionais dos diversos níveis vibracionais de um determinado estado eletrônico, e os níveis rotacionais e vibracionais de um outro determinado estado eletrônico (sistema de bandas). Estes espectros são compostos por todas as bandas vibracionais da transição eletrônica, assim como, por todas suas bandas rotacionais. O espectro da fluorescência é um exemplo destes espectros que se originam de transições decorrentes entre os estados eletrônicos da matéria.

A figura abaixo mostra um diagrama representando os níveis (estados) de energia de uma determinada molécula, assim como as possíveis transições que podem ocorrer entre os mesmos. Os algarismos romanos (I) e (II) indicam dois estados eletrônicos da molécula, podendo a mesma possuir um número maior ou menor de estados eletrônicos. O símbolo (v) representa os (n) estados vibracionais da molécula, já o símbolo (j) representa os (m) estados rotacionais da mesma. As letras (a), (b) e (c), representam respectivamente, as seguintes possíveis transições: rotacional; rotacional-vibracional e eletrônica (HECHT, 2002).



Figura 1: Níveis de energia de uma molécula: rotacional (j), vibracional (v) e eletrônico (algarismos romanos). As setas indicam as possíveis transições: (a) rotacional, (b) rotacional-vibracional e (c) eletrônica.

2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica baseada no espalhamento inelástico da luz pela matéria (efeito Raman). Este efeito pode ser compreendido como sendo um espalhamento onde ocorre a mudança de freqüência da luz monocromática incidente, mediante a interação da mesma com a matéria. Este efeito foi previsto por Adolf Smeakel (HECHT, 2002), em 1923 e observado experimentalmente, em 1928, pelo então professor da Universidade de Calcutta, Chandrasekhara Vankata Raman, de onde o fenômeno ficou conhecido como efeito Raman ou espalhamento Raman. Já em 1930 a espectroscopia se tornou o principal método de análise não-destrutiva (garantia a integridade física da amostra), o que levou C. V. Raman a receber um prêmio Nobel (IBACH e LÜTH, 1993).

2.2.1 PROCESSO DE FORMAÇÃO DO SINAL RAMAN

O efeito Raman está associado à indução do momento de dipolo na molécula, pelo campo elétrico da radiação incidente de excitação, em uma determinada amostra. Ou seja, pela polarizabilidade molecular (ANDERSON, 1973).

Pela teoria clássica (IBACH; LÜTH, 1993; SALA, 1996), pode-se representar o momento de dipolo induzido através da equação (2):

$$\vec{P} = a \vec{E}$$
 [2]

Onde:

- \vec{P} representa o vetor do momento de dipolo induzido da molécula;

- *a* representa a polarizabilidade da molécula (capacidade de separar cargas dentro da molécula);

- \vec{E} representa o vetor campo elétrico da radiação incidente de excitação.

A polarizabilidade da molécula (a), pode ainda ser expandido em série da coordenada interna (q), representada pela equação (3):

$$\boldsymbol{a} = \boldsymbol{a}_0 + \left(\frac{d\boldsymbol{a}}{dq}\right)_0 \cdot q + \dots \quad [3]$$

Supondo:

$$q = q_0 \cdot \cos(2\mathbf{p}v_{vib}t)$$
 [4]
$$E = E_0 \cdot \cos(2\mathbf{p}v_0t)$$
 [5]

Onde (v_{vib}) e (v_0) representam respectivamente, a freqüência vibracional e a freqüência da radiação incidente.

Logo, o momento do dipolo induzido pode ser representado assim como na equação (6):

$$\vec{P} = \boldsymbol{a}_0 \cdot E_0 \cdot \cos(2\boldsymbol{p}v_0 t) + \left(\frac{d\boldsymbol{a}}{dq}\right)_0 \cdot q_0 \cdot E_0 \cdot \cos(2\boldsymbol{p}v_0 t) \cdot \cos(2\boldsymbol{p}v_{vib} t) + \dots$$
[6]

Considerando que os termos de ordem superior podem ser desprezados para pequenas vibrações e aplicando a equação (6) a seguinte identidade trigonométrica dada pela equação (7):

$$\cos(A) \cdot \cos(B) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$$
 [7]

Teremos:

$$\vec{P} = \mathbf{a}_{0} \cdot E_{0} \cdot \cos(2\mathbf{p}v_{0}t) + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{d\mathbf{a}}{dq}\right)_{0}^{2} q_{0} \cdot E_{0} \left\{\cos\left[2\mathbf{p}t(v_{0} + v_{vib})\right] + \cos\left[2\mathbf{p}t(v_{0} - v_{vib})\right]\right\}}_{\text{Espalhamento}}$$
Espalhamento
Elástico
Espalhamento
Inelástico
Espalhamento
E

Neste ponto, já é possível notar as componentes principais que compõem o sinal espalhado pelas moléculas da amostra. O primeiro termo da equação (8)

corresponde ao espalhamento elástico Rayleigh (ANDERSON, 1973), aqui representado pela equação (9):

$$Sinal_{Rayleigh} = \boldsymbol{a}_0 \cdot \boldsymbol{E}_0 \cdot \cos(2\boldsymbol{p}\boldsymbol{v}_0 t)$$
 [9]

A figura 2 ilustra o processo do espalhamento elástico, onde é possível observar que a energia da radiação espalhada é igual à energia da radiação incidente de excitação.



Figura 2: Espalhamento elástico Rayleigh.

Já o segundo termo, corresponde ao espalhamento inelástico Raman, onde por sua vez, pode ser desmembrado em dois outros termos aqui representados pelas equações (10) e (11):

$$Sinal_{Stokes} = \frac{1}{2} \left(\frac{d\mathbf{a}}{dq} \right)_0 q_0 \cdot E_0 \cos[2\mathbf{p}t(v_0 - v_{vib})]$$
[10]

$$Sinal_{Anti-Stokes} = \frac{1}{2} \left(\frac{d\mathbf{a}}{dq} \right)_0 q_0 \cdot E_0 \cos[2\mathbf{p}t(v_0 + v_{vib})]$$
[11]

A figura 3a ilustra o processo do espalhamento inelástico Stokes, onde é possível observar que a energia da radiação espalhada é menor que a energia da radiação incidente de excitação. Já a figura 3b ilustra o processo do espalhamento inelástico Anti-Stokes, onde é possível observar que a energia da radiação espalhada é maior que a energia da radiação incidente de excitação.



Figura 3: Espalhamentos inelásticos: (a) espalhamento Stokes; (b) espalhamento Anti-Stokes.

Através destes dois termos, acima mencionados, é possível compreender a simetria entre os espalhamentos inelásticos Stokes e Anti-Stokes, conforme mostra a figura 4:



Figura 4: Relação entre os espalhamentos.

O termo $\left(\frac{d\mathbf{a}}{dq}\right)_0$ representa a taxa de variação da polarizabilidade, a qual determinará a contribuição dos dois últimos termos da equação (8). Sendo assim, para que se tenha o espalhamento inelástico é necessário que se estabeleça a "regra de seleção", apresentada na equação (12), (IBACH; LÜTH, 1993; SALA,1996):

$$\left(\frac{d\mathbf{a}}{dq}\right)_0 \neq 0 \qquad [12]$$

2.2.2 INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA PARA MEDIDAS RAMAN

O sistema apresentado na figura 5 apresenta uma entre outras diversas configurações possíveis de implementação de sistemas dedicados às medidas Raman. Nota-se a apresentação de uma instrumentação básica, apenas o mínimo necessário para a realização das medidas. No caso de uma otimização do sistema, faz-se necessária à inclusão de mais componentes ópticos ou até outras novas configurações no "layout" do mesmo.



Figura 5: Instrumentação básica para medidas Raman.

O sistema básico desenvolvido para mediadas Raman pode ser dividido em três partes principais, sendo elas: fonte de excitação; captura e filtragem do sinal e, por fim, manipulação e armazenamento do sinal.

A primeira parte do sistema, diz respeito à fonte de excitação da amostra, a qual compreende uma fonte de luz qualquer (lâmpada, laser, etc.). Atualmente, é utilizado o laser (Fig. 5 - 1) como fonte de excitação, devido ao fato de ser uma luz monocromática, com ajuste de potência, com a possibilidade de sintonização do comprimento de onda, além de outras vantagens. Ainda nesta primeira parte do sistema, são mostrados alguns elementos ópticos (lentes e espelhos), responsáveis, respectivamente, pela focalização e direcionamento do laser de excitação na amostra (Fig. 5 – 2 e 3).

O laser de excitação incide sobre a amostra, a qual, por sua vez, encontra-se posicionada em um porta-amostras (Fig. 5 - 4). O porta-amostras possui flexibilidade de movimentação nos eixos XYZ e azimute, permitindo-se assim um melhor posicionamento das amostras.

A segunda parte do sistema corresponde aos componentes ópticos (telescópio), responsáveis pela captura e filtragem do sinal espalhado pela amostra (Fig. 5 - 5). Mesmo que a configuração do "Layout" do sistema direcione a maior parte da luz elástica espalhada pela amostra para o infinito, como mostra a figura acima, ainda sobra uma pequena parcela da mesma devendo ser filtrada antes que o sinal capturado seja guiado para dentro do espectrômetro (Fig. 5 - 6).

Depois de capturado e filtrado, o sinal espalhado é então focalizado na entrada do espectrômetro, o qual através de um sistema interno de grades de difração irá separar o sinal espalhado em suas componentes principais, direcionando-as a uma Câmera CCD (Fig. 5 - 7), a qual tem como função de capturar estes sinais separados e enviá-los ao computador sob a forma de espectros.

Chega-se, então a última parte do sistema básico para medidas Raman, onde os dados que chegam ao computador (Fig. 5 - 8) são apresentados sob a forma de espectros, podendo sofrer algumas manipulações, realizadas através de alguns softwares específicos, e/ou serem armazenados para uma futura análise.

2.3 FATORES DE INTERFERÊNCIA QUE MASCARAM O ESPECTRO RAMAN

2.3.1 LUMINESCÊNCIA (FLUORESCÊNCIA / FOSFORESCÊNCIA)

A luminescência é a emissão de radiação luminosa por um determinado material. Sua origem está ligada a transições entre os estados eletrônicos. A figura 6 mostra as transições entre estados de energia para espalhamentos elástico / inelástico e também para o caso da fluorescência. Nota-se que nos casos dos espalhamentos elástico e inelástico, as transições de energia ocorrem entre os estados vibracionais de um determinado estado eletrônico; já a transição da fluorescência, ocorre entre os estados de excitação eletrônica. Daí já se pode concluir que a radiação emitida pelos espalhamentos elástico e inelástico é muito menor do que a radiação emitida pela fluorescência.



Figura 6: Transições dos espalhamentos (elástico/inelástico) e da fluorescência entre os estados de atômicos de energia.

A luminescência, geralmente é dividida em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência (LAKOWICZ, 2006).

O fenômeno de fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado eletrônico fundamental para um estado eletrônico excitado. A combinação (elétron-buraco) entre elétrons do estado eletrônico excitado, com os buracos do estado fundamental, faz com que ocorra o retorno destes elétrons ao estado fundamental. Durante o retorno ao estado fundamental, ocorre a emissão de radiação luminosa simultaneamente.

As taxa de emissão de fluorescência são tipicamente muito rápidas (10⁸ s⁻¹), tornando seu tempo de vida muito curto (10 ns).

Já na fosforescência, o retorno para o estado fundamental, torna a taxa de emissão de radiação luminosa muito lenta (10³ a 10⁰ s⁻¹). Consequentemente, seu tempo de vida torna-se muito longo, tipicamente da ordem de milisegundos a segundos.

Uma propriedade básica da fluorescência é que esta só dura enquanto há a presença de um estímulo, diferentemente da fosforescência (EFREMOV, 2007).

Em amostras biológicas, excitadas no visível, há forte emissão de fluorescência, mascarando as bandas Raman, visto que a fluorescência tem um tempo de vida muito maior do que o sinal Raman (tipicamente da ordem alguns femtosegundos), mas muito pequeno se comparada ao sinal de fosforescência (MOSIER-BOSS;

LIEBERMAN; NEWBERY, 1995; ZHAO; CARRABBA; ALLEN, 2002; SHREVE; CHEREPY; MATHIES, 1992).

A figura 7 mostra um exemplo de espectro Raman, obtido através de uma amostra de uma mama sadia de um rato de laboratório Sprague-Dawley, com a presença da fluorescência como sinal interferente.



Figura 7: Espectro Raman com fluorescência. As setas indicam as principais bandas Raman do sinal, sendo mascaradas pela fluorescência.

Existem várias formas de minimizar este problema, como por exemplo, não deixando impurezas que causam fluorescência nas amostras analisadas (fluorescência devido a impurezas), ou mudando-se o comprimento de onda da fonte de excitação para a região UV, ou para a região do infravermelho (fluorescência devido à própria amostra). No caso da fluorescência gerada a partir da própria amostra, mudando-se o comprimento de onda da fonte de excitação para a região do infravermelho, será reduzida a fluorescência. Porém, devido ao fato da instrumentação óptica para a região UV ser muito cara e limitada, lasers com o comprimento de onda na região do infravermelho próximo são altamente empregados em instrumentação Raman comercial, apesar das intensidades dos picos Raman também diminuir devido ao aumento do comprimento de onda da fonte de excitação. Geralmente, são utilizados lasers com I = 785 nm, para aplicações em sistemas Raman dispersivo e lasers com I = 1064 nm, para aplicações em sistemas FT-Raman (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; LAKOWICZ, 2006).

Outra forma de se eliminar os efeitos da luminescência sobre os espectros Raman seria o de aplicar algum método próprio para este fim. O método SERDS, é um dos métodos que já foram desenvolvidos justamente com esta finalidade e tem demonstrado ótimos resultados.

2.3.1.1 O MÉTODO SERDS

O método SERDS, Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy, (SHREVE; CHEREPY; MATHIES, 1992), baseia-se na aquisição de dois espectros Raman, excitados por duas linhas de laser com seus *I* ligeiramente deslocados entre si. Como propriedade inerente à fluorescência, a mesma não sofre nenhuma mudança com o deslocamento do comprimento de onda do laser de excitação (ΔI). Porém, os picos Raman deslocam-se na mesma proporção de ΔI , tornando-se então possível, a recuperação dos espectros Raman, livre de fluorescência. Faz-se importante a observação de que os efeitos da fluorescência sobre os dois espectros Raman capturados são iguais para ambos e acrescentando ainda, o fato da mesma não sofrer nenhuma mudança com o deslocamento ΔI do laser de excitação, justifica-se a possibilidade de eliminar estes efeitos sobre os espectros capturados, através da subtração entre os mesmos. Este processo resulta em um espectro conhecido como Espectro Raman Diferencial (dS), o qual é utilizado para a recuperação do espectro Raman final, livre dos efeitos da fluorescência e de ruídos.

Apesar deste método, estar se mostrando ser eficiente na remoção da fluorescência dos espectros, faz-se importante advertir de que o mesmo não possui uma fácil repetibilidade e não é aplicável em análises de amostras desconhecidas, além de ser vulnerável a erros cometidos pelo operador durante todo o processo de análise (ZHAO; CARRABA; ALLEN, 2002).

Uma variação deste método foi demonstrada por Mosier-Boss e colaboradores (MOSIER-BOSS; LIBERMAN; NEWBERY, 1995), onde não havia deslocamento no comprimento de onda do laser de excitação (ΔI), mas sim uma pequena movimentação no ângulo da grade de difração do espectrômetro (? F), entre a aquisição de cada um dos dois espectros, ou seja para cada um dos dois espectros, os mesmos são capturados com a grade de difração do espectrômetro em ângulos ligeiramente diferentes.

Zhao e colaboradores mostraram em seus estudos que um espectro Raman capturado por um feixe de laser com um único λ contém menos informações se comparados a um espectro resultante de um processo em que são utilizados dois *I* de um laser de excitação, ligeiramente deslocados entre si. Os mesmos afirmam que com a utilização do método SERDS é possível de se obter um espectro Raman resultante, livre de fluorescência e de ruídos (ZHAO; CARRABA; ALLEN, 2002).

2.3.2 ETALONING

O sinal de "etaloning" é um sinal formado pela sobreposição de múltiplos sinais refletidos, entre duas superfícies refletoras, as quais, geralmente, são superfícies paralelas entre si. Ocorre em alguns elementos ópticos do sistema, como nos filtros ou no detector CCD, por exemplo.

O sinal de etaloning, por possuir uma característica de ser um sinal periódico, interfere, modulando sinal Raman do espectro capturado. Sendo assim, necessária à filtragem dos espectros capturados, para eliminá-lo, ou pelo menos diminuir seus efeitos.

O sinal interferente surge das seguintes formas: quando os feixes transmitidos estão em fase entre si, ocorre uma interferência construtiva, significando a transmissão dos picos máximos do etaloning. Já, quando os feixes transmitidos não estão em fase entre si, ocorre uma interferência destrutiva, significando a transmissão dos picos mínimos do etaloning. Para nosso sistema, tanto faz uma situação ou outra, pois nenhum dos dois casos é desejado. O ideal é a otimização dos circuitos ópticos do sistema para minimizar a ação do etaloning, podendo-se até eliminar sua presença. Para tanto, deve-se estudar todas as características físicas e funcionais de cada um dos componentes dos circuitos ópticos, além de estar atento ao comprimento de onda da fonte de excitação. Dados estes que permitem o cálculo de previsão de seu aparecimento (caso ocorra), interferentes aos espectros Raman capturados (YOUNG, 1998; HECHT, 2002).

A figura 8 mostra duas situações onde ocorre a presença do etaloning no Espectro Raman de uma determinada amostra. Na primeira situação (Fig. 8 - a), é

possível observar a presença de um sinal de etaloning (devido ao filtro notch posicionado no circuito óptico após a amostra), adicionado ao espectro Raman de uma amostra de um dente humano, modulando o mesmo. Já na segunda situação (Fig 8 - b), é possível observar a presença do etaloning (devido ao detector CCD), adicionado ao espectro Raman de uma amostra da pele de um dedo humano.



Figura 8: Etaloning: a) devido ao filtro notch do sistema; b) devido ao CCD do sistema.

Uma possível solução para o problema de interferência do etaloning em espectros Raman pode ser dado através de ajustes nos ângulos dos filtros, podendo até ter que mudar as posições dos mesmos, no circuito óptico. Já no caso do etaloning devido ao CCD, a solução recomendada é a redução da potência de excitação, visando não excitar tanto etaloning.

2.3.3 RAIOS CÓSMICOS

Já os raios cósmicos, são originados de partículas subatômicas extremamente penetrantes, com alta energia (10⁸ a 10²⁰ eV), que se deslocam pelo espaço sideral a velocidades próximas a velocidade da luz. São recebidos em quantidades iguais, vindo de todas as direções, devido as suas mudanças de trajetórias na presença de diferentes campos magnéticos. Por sua energia ser muito alta, cientistas acreditam que suas origens partam de um fenômeno de alta energia como a explosão de uma supernova.

Ao atingirem a atmosfera Terrestre, estas partículas colidem com os núcleos dos átomos da mesma, dando origens a outras partículas, com menos energia, chamados de raios cósmicos secundários. Os raios cósmicos secundários são inofensivos à vida na Terra, e são facilmente detectados na mesma, porém os raios cósmicos primários são ofensivos à vida na Terra e só são detectados no espaço (KARTTUNEN et. al., 1996).

Esses raios ao interagirem com a sílica contida no detector CCD, originam picos muito intensos e muito estreitos (spikes), que são adicionados ao espectro Raman, devendo ser removidos do mesmo. Uma forma de tentar eliminar sua presença nos espectros é diminuir ao máximo o tempo de aquisição dos espectros. Nota-se que alguns laboratórios que atuam nesta área, já são construídos em regiões onde a incidência destes raios é menor.

A figura 9 mostra um espectro Raman, obtidos a partir de uma amostra de dente humano, contendo alguns raios cósmicos como sinais interferentes:



Figura 9: Raios Cósmicos adicionado ao espectro Raman.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DETALHADA DOS EQUIPAMENTOS ÓPTICOS UTILIZADOS

3.1.1 O LASER

Foram utilizados dois lasers de diodo com cavidade externa, modelo Littrow, da empresa Sacher Lasertechinik (Fig. 10), centralizados em 785 e 830 nm.



Figura 10: Módulo de corrente / cabeça do laser. Fonte: Sacher (2006).

Ambos os lasers estão divididos em duas partes principais: módulo de corrente e cabeça do laser.

O módulo de corrente controla todas as funções da cabeça do laser, tanto na parte de monitoração de algumas variáveis internas como a temperatura, por exemplo, quanto no controle da fonte de corrente do diodo laser (Fig. 10). O diodo laser ao ser alimentado por uma corrente elétrica, emite uma luz (seta preta), a qual é direcionada a uma grade (rede) de difração (Fig. 11). Dependendo do ângulo (q) da grade, apenas um comprimento de onda (I), da luz difratada pela mesma é selecionado a retornar na direção do diodo, seguindo o mesmo caminho, mas em direção oposta. A face do diodo a qual receberá este sinal de retorno da grade de difração é tratada de modo a refletir este sinal de volta, em direção à grade de

difração (HECHT, 1992). Percorrendo-se, o mesmo caminho em direção oposta novamente. Criando-se então, um ressonador externo entre a face do diodo e a grade de difração (cavidade externa), o qual dependerá principalmente da distância (L₂), para seu funcionamento. As sucessivas reflexões dentro da cavidade geram uma sobreposição de sinais, onde sinais com (I) igual ao selecionado pela grade, geram interferências construtivas; enquanto os sinais de (I) diferentes, geram interferências destrutivas, anulando-se entre si. Os sinais com interferências construtivas, sobrepõem-se resultando em um sinal com o mesmo (I), porém amplificado e para um determinado valor de amplificação, este sinal atravessa a face lateral do diodo, a qual antes, o refletia (seta vermelha).

Este sinal centralizado em (I) e amplificado atravessa o diodo sendo colimado por uma lente colimadora, a qual está localizada logo após a outra face do diodo. Esta colimação será realizada de acordo com a distância (L_1) entre a lente colimadora e o diodo laser e o alcance deste feixe colimado pode variar de acordo com este último acoplamento. Por fim, o feixe de laser criado, é direcionado à porta de saída da cabeça do laser, porém antes, o mesmo deve passar por um acoplador óptico o qual permite a passagem deste feixe em apenas um sentido, não deixando que nenhum sinal externo a cabeça do laser, retorne ao diodo laser (STEEN, 1991; VERDEYEN, 1995).



Figura 11: "Cabeça" do laser: diodo laser + cavidade externa.
Segue abaixo algumas características dos feixes 785 nm e 830 nm, segundo dados retirados dos manuais do fabricante (SACHER, 2006):

⇒ Qualidade do feixe em 785 nm:

Perfil do feixe: diâmetro do foco a 1,3 m de distância da "cabeça" do laser.
 Horizontal: 4,9 mm.
 Vertical: 2,3 mm.

⇒ Qualidade do feixe em 830 nm:

Perfil do feixe: diâmetro do foco a 1,3 m de distância da "cabeça" do laser.
 Horizontal: 2,9 mm.
 Vertical: 2,6 mm.

3.1.2 FILTROS ÓPTICOS

Filtros ópticos são componentes responsáveis pela redução ou até eliminação de sinais indesejáveis. Podem atuar sobre apenas um determinado comprimento de onda, em uma determinada banda ou até em várias bandas, dependendo, principalmente, do material com que foi feito. Porém, só devem ser utilizados em casos onde seu uso for realmente necessário, pois assim como qualquer outro componente óptico, os filtros também atenuam o sinal que passa através do mesmo. Devendo-se assim, ter sua aplicação no circuito óptico, previamente analisada.

Nesta sessão serão demonstrados alguns tipos de filtros que foram usados nos sistemas ópticos montados, com suas respectivas características e aplicações.

Os filtros apresentados abaixo, são filtros da empresa Semrock, a qual possui uma ótima proficiência nesta área.

Dentre os diversos tipos de filtros com que a empresa Semrock trabalha, foram utilizados os seguintes filtros: filtros passa-alta e filtros notch.

3.1.2.1 FILTROS PASSA-ALTA

Estes filtros têm como característica principal, permitir a passagem de qualquer comprimento de onda superior a seu comprimento de onda de corte; barrando a passagem de qualquer comprimento de onda inferior a seu comprimento de onda de corte. As curvas características para os filtros passa-alta em 785 e 830 nm são mostradas nas figuras 12 e 13 respectivamente.





Figura 12: Filtro passa-alta LP02-785RU-25. Fonte: Semrock (2007).

Figura 13: Filtro passa-altaLP02-830RU-25. Fonte: Semrock (2007).

Pela análise dos respectivos gráficos pode-se perceber que os filtros passa-alta só deixam passar sinais com comprimentos de onda acima do comprimento de onda do laser de excitação. Por exemplo, para o laser de excitação de 830nm o filtro passa-banda LP02-830RU-25 deixará passar apenas sinais acima de 830 nm, com eficiência de mais de 90 %.

Estes filtros são bons para nossas aplicações, pois evitam que sinais espalhados pela amostra, que estão abaixo do comprimento de onda do laser de excitação sejam detectados pelo detector do espectrômetro. Inicialmente estes filtros foram utilizados nas saídas dos lasers(configuração 0°), a fim de eliminar sinais abaixo do comprimento de onda dos lasers. Devido ao fato de que os lasers não apresentaram impurezas significativas perto de seu comprimento de onda, ficou estabelecido que não fosse necessário o uso destes filtros. Sendo assim, os mesmos foram retirados dos circuitos ópticos.

3.1.2.2 FILTROS NOTCH

Estes filtros têm como característica principal, permitir a passagem de qualquer comprimento de onda superior ou inferior a seu comprimento de onda de corte; barrando a passagem apenas de uma banda específica, próxima a seu comprimento de onda de corte. As curvas características para os filtros notch em 785 e 830 nm são mostradas nas figuras 14 e 15 respectivamente.



Os gráficos dos filtros notch estão representados pela densidade óptica (OD) e não pela transmitância em (%). Indiretamente a densidade óptica mede a transmitância através de um componente óptico, sendo seu valor calculado pelas equações (13) e/ou (14) (NEWPORT, 2006):

$$OD = -\log (T)$$
 [13]
 $T = 10^{-OD}$ [14]

Sendo assim, quanto maior for o valor de OD, menor é o valor de transmitância do sinal, ou seja, o quanto o sinal naquele comprimento de onda, tende a ser barrado (SEMROCK, 2007).

Para os circuitos ópticos desenvolvidos, os filtros notch foram utilizados, na intenção de bloquear o máximo possível o sinal elástico refletido pela amostra e que será direcionado ao detector do espectrômetro. Para tanto, foram posicionados em uma configuração a 0° em relação ao feixe incidente.

3.1.3 ESPELHOS

Neste trabalho foram utilizados espelhos redondos (Broadband Super Mirrors), da empresa Newport, o qual é um espelho dielétrico de alta performance (refletância > 99,9 %), em uma grande banda de comprimentos de ondas, independente de polarização ou ângulo de incidência do feixe, a qual pode ser de 0 ° à 45 ° (NEWPORT, 2006).



Figura 16: Espelhos redondos 10CM00SB.2 (Broadband Super Mirrors), para o IR próximo. Fonte: Newport (2006).

Em sua construção, são depositados produtos químicos formando uma camada (filme), que aumentam a performance do espelho. Neste caso foram comprados espelhos dielétricos com filme SB.2., o qual melhora a performance dos espelhos de acordo com os gráficos da figura 17. Note que estes gráficos mostram as respostas de atuação para 0° (Fig. 17a) e para 45° (Fig. 17b).



Figura 17: Filmes dos espelhos (Broadband Super Mirrors). Atuação: (a) em 0°; (b) em 45°. Fonte: Newport (2006).

3.1.4 LENTES:

Ao descrever sobre lentes (tipos, características, aplicações, etc.), deve-se primeiramente, enfatizar sobre alguns termos técnicos que serão aplicados a mesma. A figura 18 mostra como exemplo, uma lente e suas fórmulas mais comuns aplicadas:



Figura 18: Propriedades das lentes (formação de imagem). Fonte: Griot (2006).

Onde:

- F = Diâmetro da lente;
- CA = Abertura efetiva da lente (~ 90 % do F);
- f-number (f/#): mede a habilidade da lente de recolher luz, calculado conforme a equação (15):

$$f - number(f / \#) = \frac{f}{CA}$$
 [15]

• Abertura Numérica (NA); define o ângulo cônico máximo de luz recebido ou emitido por um sistema óptico (lente). Calculada através da equação (16):

$$NA = sen(\mathbf{q}) = \frac{CA}{2 \cdot f}$$

$$NA = \frac{1}{2 \cdot (f - number)}$$
[16]

- Distância focal (f): é a distância compreendida entre a superfície externa da lente e o ponto onde a lente converge o sinal (ponto focal ou foco).
- Magnificação (m): refere-se à ampliação de um objeto feito pela lente. É a relação do tamanho da imagem produzida pela lente, com o tamanho atual do objeto. Calculado pela equação (17):

$$m = \frac{S''}{S} = \frac{h''}{h} \qquad [17]$$

 Ângulo entre o feixe de luz incidente e a normal da lente (?), calculado através da equação (18):

$$\boldsymbol{q} = \operatorname{arcsen}\left(\frac{\mathrm{CA}}{2\cdot \mathrm{s}}\right) \quad [18]$$

- Distância do objeto (S): positiva quando o objeto se encontra do lado direito em relação ao ponto H.
- Distância da imagem (S"): positiva quando se encontra do lado esquerdo em relação ao ponto H".
- Altura do objeto (h);
- Altura da imagem (h");

(GRIOT, 2006; YOUNG, 1998).

Neste trabalho, foram utilizadas lentes plano-convexas e lentes bi-convexas, todas fabricadas pela empresa Newport. Antes de explicar as diferenças entre elas, devemos explicar o porquê de se ter escolhido lentes BK 7. Este código, se refere a um material que é excelente para trabalhar com sinais na região do visível e do infravermelho próximo. São lentes de precisão, com filmes anti-reflexo AR.16, que garantem uma reflexão de baixa porcentagem, sendo transmitido o máximo do sinal incidente. Seu índice de refração é de 1.52 (GRIOT, 2006).

As lentes plano-convexas utilizadas (Fig. 19) possuem as características discriminadas na tabela 1:



Figura 19: Lentes plano-convexas (BK7-AR.16). Fonte: Newport (2006).

M	odelo	Diâmetro (mm)	EFL (mm)	f/#	BFL (mm)
KF	PX076	25.4	25.4	1.0	16.95
KF	PX079	25.4	38.1	1.5	33.06

25.4

Tabela 1: Parâmetros das lentes plano-convexas. Fonte: Newport (2006).

KPX100

O gráfico apresentado na figura 19, representa a curva de resposta de refletância em (%) devido ao filme AR.16, destas lentes plano-convexas (tabela 1). Este valor de refletância é dado para aplicações na região do infravermelho próximo (NIR), onde a luz incidente passe perpendicularmente com o eixo da lente. Nota-se que para os comprimentos de onda em 785 e 830 nm será refletido pela lente algo abaixo de 0,5 % do sinal incidente.

150

5.9

147.33

As lentes bi-convexas utilizadas (Fig. 20), possuem as seguintes características discriminadas na tabela 2.



Figura 20: Lentes bi-convexas (BK7-AR.16). Fonte: Newport (2006).

Tabela 2: Parâmetros das lentes bi-convexas. Fonte: Newport (2006).

Modelo	Diâmetro (mm)	EFL (mm)	f/#
KBX052	25.4	50.2	1.9

O gráfico apresentado na figura 20, representa a curva de resposta de refletância em (%) devido ao filme AR.16, destas lentes bi-convexas (tabela 2). Este valor de refletância é dado para aplicações na região do infravermelho próximo (NIR), onde a luz incidente passe perpendicularmente com o eixo da lente. Nota-se que para os comprimentos de onda em 785 e 830 nm será refletido pela lente algo abaixo de 0,5 % do sinal incidente.

3.1.5 ESPECTRÔMETRO + DETECTOR (CCD)

O espectrômetro é um equipamento óptico que separa a luz que está em sua entrada em todas as componentes (?) que a compõe, utilizando-se para isto uma grade de difração.

O espectrômetro utilizado neste trabalho é o SpectraPro-2500i da empresa Pi-Atcon, o qual possui 3 grades de difração selecionáveis, sendo elas de 300 gr. / mm, 600 gr. /mm e de 1200 gr. / mm. A figura 21 mostra uma foto do espectrômetro, assim como ilustra seus componentes ópticos internos.



Figura 21: Espectrômetro SpectraPro-2500i (PiActon).

Como se pode ver, o sinal que entra pela entrada (slit), do espectrômetro, é guiado para um espelho, o qual desvia este sinal para um espelho colimador. Este espelho colimador envia o sinal colimado (paralelo) até uma das três grades de difração. Esta grade separa o sinal em suas componentes (comprimentos de onda que o compõe). Assim que o sinal é decomposto, o mesmo é guiado a um espelho focalizador, que será responsável por focalizar todo o sinal decomposto na porta de saída do espectrômetro, onde será detectado pelo detector CCD, instalado nesta porta. Todo este circuito óptico interno do espectrômetro está configurado em um sistema Czerny-Turner (PALMER, 2005; LOEWEN, 1997). A figura 22 demonstra a configuração deste sistema:



Figura 22: Configuração Czerny-Turner (Espectrômetro). Fonte: (GRIOT, 2006).

O princípio de funcionamento da grade de difração é idêntico a da grade utilizada no laser, a qual variando seu ângulo de inclinação faz com que a mesma responda (difrata), a um determinado comprimento de onda diferente dentro de uma determinada região espectral, separando-o em suas componentes principais. O princípio de funcionamento da grade é simples também, aqui demonstrado pela figura 23:



Figura 23: Grade de difração. Fonte: Palmer (2005).

Geralmente estas grades são superfícies refletoras (espelhos), que contém sulcos que podem ser feitos de forma física ou por deposição química de matérias sobre a superfície. Quando um feixe de radiação incide sobre a superfície da grade, fazendo um ângulo (i) em relação a uma reta normal da superfície da grade; a grade difrata (separa) este feixe em vários outros feixes, com diferentes ângulos e diferentes comprimentos de onda. A difração principal ocorre com um ângulo (i') em

relação a normal da grade. A equação da grade é simples e pode se descrito pela equação (19), (PALMER, 2005; YOUNG, 1998):

$$n\mathbf{I} = d\left[\operatorname{sen}(i) + \operatorname{sen}(i')\right]$$
[19]

Onde:

n = ordem da difração

? = comprimento de onda difratado

- d = constante da grade (distância entre os sucessivos sulcos da grade)
- i = ângulo de incidência medido em relação a normal.
- i'= ângulo de difração medido em relação a normal.

O parâmetro *Blaze* informa para qual comprimento de onda a grade possui uma maior eficiência de difração. Para as três grades utilizadas neste espectrômetro, o parâmetro *Blaze* indica que as mesmas possuem uma maior eficiência de difração em 785 nm. Nota-se que as fontes de excitação (lasers), utilizados estão centrados em 785 nm e 830 nm, ou seja, pode-se considerar que as grades estão otimizadas para estes circuitos ópticos.

O detector CCD (Princeton, Spec-10), nada mais é do que um dispositivo óptico, refrigerado por nitrogênio líquido, composto por uma matriz de células fotos-receptoras, que por sua vez compõem uma área de captura de 1340X400 pixels. Esta matriz de células foto-receptoras ao receber um sinal luminoso transforma-o em um sinal elétrico o qual, logo após, será enviado ao computador para ser interpretado e transformado em espectros.

3.1.6 OS PORTA-AMOSTRAS

Os porta-amostras consistem em dispositivos especialmente elaborados para cada um dos dois sistemas desenvolvidos neste trabalho. Dispositivo este, responsável por posicionar as amostras durante o processo de aquisição. Faz-se importante lembrar que, para cada um dos dois sistemas (*n Vitro / In Vivo*), foi elaborado um projeto de um porta-amostras diferente, assim como foi realizado a

montagem dos mesmos. A figura 24 mostra respectivamente: a) o porta-amostras para o sistema *In Vitro*; e b) o porta-amostras para o sistema *In Vivo*.



Figura 24: Porta-amostras: a) Sistema In Vitro e b) Sistema In Vivo. Nos detalhes os ambientes de fixação das amostras.

O porta-amostras do sistema *In Vitro* é compostos por elementos transladores (micrômetros), que lhe permite a movimentação da amostra nos eixos XYZ e azimute. Já o porta-amostra do sistema *In Vivo*, é composto por uma mesa, a qual é utilizada como uma base de apoio para as amostras e, por um braço mecânico, no qual está acoplado a parte distal do cateter (fibra), permitindo-se, então, a movimentação do cateter sobre a amostra no eixo Z. Nota-se a possibilidade de um ajuste no ângulo do cateter sobre as amostras. Observa-se, também que existe a possibilidade da movimentação nas direções dos eixos XY para as amostras neste sistema também, devendo para tanto, movimentar a amostra sob o cateter, ou seja, neste sistema existe total liberdade para o posicionamento do cateter de excitação sobre as amostras.

3.1.7 O CATETER (FIBRA ÓPTICA)

O cateter (EMVISION LLC), ou sonda, é constituído por fibras ópticas e filtros. Possui algumas subdivisões, cada qual com suas respectivas funções e que determinam os nomes das suas três terminações. A primeira delas é chamada de porção de excitação (Fig. 25a), a qual é responsável por coletar a luz do laser de excitação incidente; a segunda delas é chamada de porção distal (Fig. 25b), a qual é responsável por incidir o laser de excitação na amostra. Existe apenas uma fibra óptica entre a porção de excitação e a porção distal. A porção distal, também tem a função de coletar os sinais espalhados pela amostra e, em seguida, enviá-los ao espectrômetro. Para isso ela conta com o auxílio de seis fibras, as quais partem da porção distal e chegam ao espectrômetro na última das três subdivisões, conhecida como porção proximal (Fig. 25c). No sistema In Vivo, foi utilizado um cateter que possuía um filtro passa-banda (785 nm) na porção de excitação, fazendo-se assim, com que o laser de excitação incidente, entre na fibra já filtrado em um determinado comprimento de onda, neste caso em 785 nm. Já na extremidade oposta do cateter, ou seja, na porção proximal, foi utilizado um filtro notch (785 nm), visando barrar a passagem da porção elástica dos sinais espalhados pela amostra. Por fim, pode-se concluir que o cateter começa pela porção de excitação, passa pela porção distal e termina na porção proximal. Faz-se importante lembrar de que em nosso sistema os filtros utilizados foram todos para ? = 785 nm, devido ao fato do nosso laser de excitação estar centrado neste comprimento de onda.



Figura 25: Cateter (785 nm): sistema In Vivo. Nos detalhes: a) porção de excitação, b) porção distal e c) porção proximal.

A figura 26 mostra o cateter utilizado pelo sistema e um diagrama de como são montadas as fibras ópticas dentro do mesmo. Observa-se que na porção de excitação existe apenas uma fibra centralizada, a qual se estende até a região da porção distal, posicionando-se também no centro da mesma. Ainda na porção distal são acopladas seis fibras para a coleta dos sinais espalhados pela amostra, onde cada uma delas encontra-se ao redor da fibra que vem da porção de excitação. Já na porção proximal, as fibras de coleta chegam todas enfileiradas.



3.2 AS AMOSTRAS

As amostras *In Vitro* utilizadas neste trabalho foram dentes humanos saudáveis (terceiro molar), os quais foram previamente fatiados em formatos de disco de 4 mm de espessura e previamente caracterizados por estudos anteriores (SOARES, 2003). A figura 27 mostra discos de dente humano, assim como as setas indicam a localização da região analisada.



Figura 27: Amostras (In Vitro): discos de dentes humanos. Nos detalhes (setas), a localização das regiões estudadas.

Foram realizadas várias capturas de espectros para identificar as regiões de maior sinal do dente humano, resultando na seleção do esmalte como melhor região,

seguido da dentina; conforme é mostrado na literatura (BACHMAN et. al., 2003; CHAKRABORTY et. al., 2006; PENEL et. al., 1998; TSUDA; ARENDS, 1994). Portanto, a região de divisa entre o esmalte e a dentina foi o ponto selecionado para a aquisição dos espectros. Devido ao conhecimento prévio dos espectros Raman desta amostra indicar bandas marcantes e de fácil análise, fato este que determinou que o dente seria uma amostra muito boa para ser utilizada como parâmetro de calibração dos sistemas, ou seja, seus espectros encontrados na literatura eram utilizados na comparação com os espectros adquiridos pelos sistemas ópticos, indicando se os sistemas estavam otimizados ou não.

Já as amostras *In Vivo*, utilizadas neste trabalho foram o dedo humano de um estudante voluntário (Fig. 28a), e a mama de um rato de laboratório Sprague-Dawley (Fig 28b). A amostra do dedo humano não teve nenhum tratamento significativo prévio, com exceção é claro, de uma prévia higienização local (ponta do dedo indicador). Já a amostra da mama da rata, foi submetida a uma prévia preparação segundo a metodologia apresentada em trabalhos anteriores (BARROS, 2004).



Figura 28: Amostras (In Vivo): dedo humano e mama de rata Sprague-Dawley. Nos detalhes (setas), a localização das regiões estudadas.

3.3 SOFTWARES UTILIZADOS

Neste trabalho foram utilizados diferentes softwares para as mais diversas funções, sendo aqui citados os de maior relevância. Primeiramente, pode-se citar o software Pilot PC OEM Terminal (Sacher Lasertechinik GmbH), responsável pelo controle do laser (corrente do diodo, potência, temperatura de trabalho, etc). Na

seqüência, pode-se citar o software WinSpec/32 (PI-Acton), o qual foi o responsável por todo o controle do espectrômetro e do CCD, ou seja, foi o responsável pela calibração e captura de todos os espectros aqui demonstrados. Por fim, faz-se importante citar o software OPUS 4.2 (Brucker Optic GmbH) e o software OriginPro 7.0 (Origin Lab Corporation), responsáveis pelas análises e manipulações matemáticas de todos os espectros capturados.

3.4 METODOLOGIA DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DIFERENCIAL

Os espectros diferenciais são gerados através da subtração de dois espectros similares de uma amostra biológica $(S_R(l_1) \in S_R(l_2))$, obtidos através de um pequeno deslocamento na linha do laser de excitação, onde cada espectro é capturado usando linhas do laser de excitação muito próximas (TRACEWELL et al., 2001). A primeira linha do laser é centralizada em um comprimento de onda definido (I_1) e a segunda é deslocada por um pequeno valor conhecido (I_2) . Como propriedade inerente à fluorescência, a mesma não sofre nenhuma mudança com o deslocamento do comprimento de onda do laser de excitação ($\Delta I = I_2 - I_1$). Porém, os picos Raman deslocam-se na mesma proporção de ΔI , tornando-se então possível, a recuperação dos espectros Raman, livre de fluorescência. Faz-se importante a observação de que os efeitos da fluorescência sobre os dois espectros Raman capturados ($S_R(I_1)$ e $S_R(I_2)$), são iguais para ambos e acrescentando ainda, o fato da mesma não sofrer nenhuma mudança com o deslocamento ΔI do laser de excitação, justifica-se a possibilidade de eliminar estes efeitos sobre os espectros capturados ($S_R(l_1)$ e $S_R(l_2)$), através da subtração entre os mesmos. Este processo resulta em um espectro conhecido como Espectro Raman Diferencial (dS(1)), o qual é utilizado para a recuperação do espectro Raman final (R(1)), livre dos efeitos da fluorescência e de ruídos (ZHAO; CARRABA; ALLEN, 2002).

O sinal total (S_R) medido, excitando-se uma amostra, através de uma fonte de excitação com um determinado I, pode ser descrito conforme a equação (20):

$$S_{R}(\boldsymbol{I}) = [L(\boldsymbol{I}) + R(\boldsymbol{I})] \cdot M(\boldsymbol{I}) + B(\boldsymbol{I})$$
[20]

Onde L(I), R(I), M(I) e B(I), são respectivamente: o sinal de luminescência (fluorescência); o sinal Raman; a resposta óptica do sistema e por fim, o "background", ou sinal de fundo do sistema.

Considerando-se duas freqüências de excitação ligeiramente diferentes (I_1 e I_2), tem-se que:

$$S_R(\boldsymbol{I}_1) = [L(\boldsymbol{I}) + R(\boldsymbol{I}_1)] \cdot M(\boldsymbol{I}) + B(\boldsymbol{I})$$
 [21]

$$S_{R}(I_{2}) = [L(I) + R(I_{2})] \cdot M(I) + B(I)$$
 [22]

A resposta óptica do sistema pode ser obtida através da medição do espectro de corpo negro de uma fonte de luz conhecida e dividindo o mesmo pelo espectro teórico desta mesma fonte de luz, conforme mostra a equação (23):

$$M(\mathbf{l}) = \frac{\text{espectro medido de um fonte de luz conhecida}}{\text{espectro teórico da fonte de luz conhecida}}$$
[23]

Resolvendo-se a diferença $S_R(I_2) - S_R(I_1)$, tem-se:

$$dS(\mathbf{I}) = S_{R}(\mathbf{I}_{2}) - S_{R}(\mathbf{I}_{1}) = [R(\mathbf{I}_{2}) - R(\mathbf{I}_{1})] \cdot M(\mathbf{I}) = dR(\mathbf{I}) \cdot M(\mathbf{I})$$
e que,

$$\Delta \mathbf{I} = \mathbf{I}_{2} - \mathbf{I}_{1}$$
[25]

Como a fluorescência não sofre nenhuma variação de energia, devido a uma ligeira variação de energia de excitação, o sinal dS(I) está totalmente relacionado ao o sinal Raman.

Sabendo-se que $dS(I) = dR(I) \cdot M(I)$, conforme mostra a equação (24), o sinal Raman puro (R(I)) é recuperado através da equação (26):

$$R(\boldsymbol{I}) = \int [\boldsymbol{d}S(\boldsymbol{I}) \cdot \boldsymbol{M}^{-1}(\boldsymbol{I})] d\boldsymbol{I} \qquad [26]$$

Na figura 29 está ilustrado todo o processo desde a aquisição dos dois espectros, passando pela diferenciação dos sinais e terminando com a recuperação das bandas do espectro, através das integrações. Faz-se importante notificar de que este é um exemplo básico de um sistema ideal, ou seja, aqui estamos adotando uma situação onde o sistema está livre de fluorescência e ruídos e com M(I) constante (linear). A intenção é apenas ilustrar o que ocorre com as bandas Raman que sofrem deslocamentos devido ao deslocamento dado na fonte de excitação, bem como o processo de recuperação do sinal. Pode-se notar que qualquer sinal que não tenha sofrido deslocamento devido ao deslocamento na fonte de excitação, como a fluorescência, por exemplo, são anulados após a subtração entres os dois espectros capturados.



Figura 29: Metodologia da espectroscopia Diferencial Raman. Nos detalhes: a) deslocamento pequeno e b) deslocamento muito grande.

A figura 29 – I (de a até d) representa todas as etapas do processo de diferenciação, fazendo-se importante ressaltar a necessidade do deslocamento (ΔI) ser curto, pois só assim as bandas originais do espectro poderão ser recuperadas. O valor correto de (ΔI) a ser utilizado será discutido mais adiante neste trabalho. A

intenção aqui é apenas ilustrar todo o processo de recuperação do espectro Raman e verificar o que ocorre caso seja escolhido um valor para (ΔI) de forma incorreta.

O processo inicia-se com a aquisição de dois espectros ($S_R(I_1) \in S_R(I_2)$), ligeiramente espaçados por um valor (ΔI) pré-definido (Fig. 29 - la). Após a aquisição dos dois espectros, os mesmos são subtraídos entre si, resultando em um sinal ($\partial S(I)$) no qual já é possível verificar as posições dos principais picos do espectro final (Fig. 29 - lb). Para cada ponto onde o sinal ($\partial S(I)$) cruza o eixo das abscissas, existe um pico do espectro final. Nota-se de antemão que estes picos estão deslocados por um valor ($\Delta I/2$), de suas posições verdadeiras, devido ao deslocamento dado antes da etapa de subtração dos espectros. Ao Integrar o sinal ($\partial S(I)$), será obtido o sinal ($R[I + (\Delta I/2)]$), o qual praticamente já possui as características do espectro resultante final, diferenciando-se apenas pelo valor ($\Delta I/2$) em que seus picos estão deslocados (Fig. 29 - lc). Por fim, ao deslocar todo o eixo das abscissas em ($\Delta I/2$), no sentido oposto ao deslocamento dado no início do processo, chega-se ao espectro resultante final (R(I)), finalizando-se assim o processo de diferenciação (Fig. 29 - Id).

Já a figura 29 – II (de a até d) mostra também, as mesmas etapas do processo de diferenciação apresentadas, porém utilizando-se um deslocamento (ΔI) muito grande. Resultando-se então, em um espectro final completamente distorcido, com bandas super alargadas que mascaram sinais adjacentes, ficando impossibilitada a recuperação das bandas originais do espectro. Vale ressaltar também, que se o deslocamento (ΔI) for de ordem exageradamente pequeno, o processo diferencial não funcionará, ficando também impossibilitado de recuperar as bandas originais do espectro (ZHAO; CARRABA; ALLEN, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MONTAGEM EXPERIMENTAL

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LASERS

As curvas de potência destes lasers estão associadas a corrente de alimentação do diodo laser, sendo assim controlada pelo módulo de corrente. Em uma rotina experimental realizada no laboratório, onde, com o auxílio do equipamento de medição "Laser Power / Energy Analyser Field Master GS" (Coherent), foi possível gerar uma tabela de dados (tabela 3), relacionando a corrente de alimentação do diodo laser com a potência de saída do laser. Através destes dados foram gerados dois gráficos, caracterizando os lasers de 785 nm e o de 830 nm.

Corrente de alimentação do diodo laser (mA)	Potência do laser centrado em 785 nm (mW)	Potência do laser centrado em 830 nm (mW)
30	0	0
40	7	2
50	15	10
60	23	18
70	30	25
80	37	32
90	44	41
100	52	46
110	58	56
120	65	65
130	71	72
140	76	75
150	80	87
160	86	94
170	96	99
180	97	107
190	108	114
200	109	124
210	115	128
220	122	138
230	128	Х
240	134	Х
250	140	Х
260	145	X

Tabela 3: Relação entre corrente de alimentação por potência de saída dos lasers.



As representações gráficas da tabela 3 são demonstradas pelas fig. 30 e 31:

Figura 30: Diagrama (laser 785 nm): Corrente de alimentação X Potência de saída.



Figura 31: Diagrama (laser 830 nm): Corrente de alimentação X Potência de saída.

Os erros nas potências de saídas (P_out) através das medidas podem ser estimados através da realização de um ajuste linear, onde o erro (ΔP_out) é calculado conforme as equações (28) e (29), onde:

$$P_out = A + B \cdot X$$
$$\Delta P_out \cong dP_out$$

$$dP_out = \frac{\partial P_out}{\partial A} \Delta A + \frac{\partial P_out}{\partial B} \Delta B + \frac{\partial P_out}{\partial X} \Delta X$$
$$dP_out = \Delta A + X \cdot \Delta B + B \cdot \Delta X$$

Para o laser de 785 nm, teremos:

$$dP_out = (0,00813) \cdot X + 1,9257$$
 [28]

Para o laser de 830 nm, teremos:

$$dP_out = (0,00671) \cdot X + 1,66575$$
[29]

Duas observações devem ser feitas a respeito dos resultados experimentais obtidos, sendo elas:

- Cada laser tem uma determinada corrente mínima e uma corrente máxima de funcionamento, devendo sempre estar operando dentro desta faixa compreendida entre os valores apresentados na tabela (4):

Tabela 4: Valores máximos e mínimos da corrente de alimentação dos lasers.

Laser (nm)	Corrente mínima (mA)	Corrente Máxima (mA)
785	30	260
830	38	220

- As curvas demonstram que a potência de saída do laser varia realmente com a variação da corrente de alimentação do diodo laser, porém de forma não linear.

Sendo assim, a potência de saída do laser inicial em nosso sistema será de 140 mW para o laser de 785 nm e de 130 mW, para o laser de 830 nm. Valores estes escolhidos, pois não é bom trabalhar com os valores dos extremos, pois isto poderia acarretar em danos ao equipamento laser.

4.1.1.1 TRANSLADORES DE COMPRIMENTO DE ONDA DO LASER

Este dispositivo foi implementado para ser acoplado à "cabeça" do laser, sendo utilizado para a mudança do comprimento de onda. O dispositivo é composto por um atuador linear, cujo deslocamento é da ordem de micrômetros. O micrômetro atua diretamente na grade de difração da cavidade externa do laser, mudando seu ângulo, fazendo-se assim, com que haja um translado de um determinado comprimento de onda.



Figura 32: Translador de comprimento de onda (laser 830 nm). No detalhe o acoplamento entre o dispositivo translador e a "cabeça" do laser.

Depois de montado, o dispositivo foi submetido a testes de histerese e repetibilidade. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 5 e na figura 33:

Posição do micrometro (μm)	Deslocamento 1 <i>I</i> (nm)	Deslocamento 2 <i>I</i> (nm)	Deslocamento 3 <i>I</i> (nm)
0,5	830,01	830,01	830,01
1,0	830,20	830,20	830,14
1,5	830,40	830,40	830,35
2,0	830,59	830,56	830,54
2,5	830,77	830,72	830,69
3,0	830,93	830,90	830,90
3,5	831,11	831,11	831,06
4,0	831,29	831,29	831,29
4,5	831,45	831,45	831,45
5,0	831,66	831,61	831,61
5,5	831,87	831,81	831,76
6,0	832,02	831,97	831,97
6,5	832,23	832,18	832,18
7,0	832,36	832,36	832,36
7,5	832,62	832,57	832,54
8,0	832,80	832,78	832,75
8,5	833,01	832,93	832,96
9,0	833,22	833,17	833,17
9,5	833,40	833,35	833,40
10,0	833,58	833,58	833,56

Tabela 5: Teste de calibração do dispositivo translador (laser 830 nm).



Figura 33: Teste de deslocamento do dispositivo translador (laser 830 nm).

O erro em (I) através das medidas pode ser estimado através da realização de um ajuste linear, onde o erro (ΔI) é calculado pela equação (30):

$$\Delta \mathbf{I} \cong d\mathbf{I}$$
$$d\mathbf{I} = \frac{\partial \mathbf{I}}{\partial A} \Delta A + \frac{\partial \mathbf{I}}{\partial B} \Delta B + \frac{\partial \mathbf{I}}{\partial X} \Delta X = \Delta A + X \cdot \Delta B + B \cdot \Delta X$$

 $I = A + B \cdot X$

$$d\mathbf{l} = 0,01383 + X \cdot (0,00231) + 0,37429 \cdot (0,005)$$
 [30]

Como pode ser visto na figura 33, os deslocamentos foram muito próximos, indicando alta repetibilidade do dispositivo para os três testes.

Devido à disposição dos componentes internos do laser de 785 nm, não permitirem espaço suficiente para o acoplamento mecânico do dispositivo translador (figura 34), seu uso ficou restrito ao laser de 830 nm.



Figura 34: Problemas com o acoplamento mecânico entre o dispositivo translador de comprimento de onda e o laser 785 nm.

Sendo assim, para o laser 785 nm, foi utilizado um outro sistema para realizar o translado do comprimento de onda do laser. Para o translado do comprimento de onda do laser de 785 nm foi utilizado apenas uma pequena chave "ALLEN", a qual

ao ser acoplada ao parafuso que movimenta a grade de difração do laser de 785 nm, permitiu a calibração dos translados, seguindo os mesmos passos como foi feito para o laser de 830 nm. Porém, seus translados foram fisicamente marcados através de pequenas marquinhas feitas com caneta no o parafuso da grade de difração e sua base, como está indicado pela seta verde na figura 34.

O processo de calibração do deslocamento do comprimento de onda do laser de 785 nm foi elaborado através de uma marca feita na cabeça do parafuso da grade de difração e outras três marcas feitas na base onde está acoplado o mesmo. O alinhamento feito entre a marca feita na cabeça do parafuso com qualquer uma das outras três marcas feitas na base, indicava um determinado deslocamento, conforme mostra a tabela 6:

Posições da chave	Comprimento de onda	Deslocamento	
(parafuso)	do laser (l) [nm]	dado (ΔI) [nm]	
А	785.0	0	
В	785.5	0.5	
С	786.0	1	

 Tabela 6: Deslocamentos aplicados ao laser de 785 nm.

Assim como foi feito para o laser de 830 nm, foram feitos vários deslocamentos entre estas três posições, verificando-se sempre, para cada caso, seus respectivos deslocamentos. Depois de executar este processo, chegou-se a conclusão de que o laser de 785 nm também possuía um deslocamento linear, podendo-se então, ser utilizado no sistema "*In Vivo*".

4.1.2 SISTEMAS ÓPTICOS IMPLEMENTADOS

Foram elaborados dois diferentes sistemas ópticos experimentais, ambos otimizados para a aquisição de espectros dispersivos Raman. O primeiro deles, corresponde a um sistema implementado para medidas *"In Vitro*", em amostras de ordem macroscópicas, as quais podem ser de origem biológica ou não. A este

sistema demos o nome de sistema Macro-Raman "*In Vitro*". Já o segundo, corresponde a um sistema implementado para medidas "*In Vivo*", também para amostras de ordem macroscópicas, as quais podem ser de origem biológica ou não. A este sistema demos o nome de sistema Macro-Raman "*In Vivo*".

4.1.2.1 SISTEMA MACRO-RAMAN IN VITRO

O sistema Macro-Raman "*In Vitro*" é composto por um laser de diodo com cavidade externa sintonizável (Sacher Lasertechnik), com ? = 830 nm, para a excitação das amostras; componentes ópticos para guiar (configuração em 45°), e coletar (telescópio), o sinal Raman espalhado; um filtro notch (Semrock, modelo NF01-830U-25), para eliminar a porção elástica do sinal espalhado; um espectrômetro (Pi-Acton SpectraPro, modelo 2500i), equipado com uma câmera CCD detectora, refrigerada por N₂ líquido (PI-Acton Spec-10), usada na captura do sinal espalhado. Por fim, por um computador, no qual serão armazenados e analisados todos os espectros capturados.

A figura 35 mostra o esquema da montagem Macro-Raman "In Vitro" desenvolvido. A figura 36 mostra uma foto da montagem experimental.



Figura 35: Montagem esquemática do sistema Diferencial Raman (In Vitro): (1) laser de excitação; (2) espelho ajustável; (3) lente convergente (focalizadora); (4) porta-amostras; (5) e (7) sistema de telescópio; (6) filtro notch (λ = 830nm); (8) espectrômetro; (9) câmera CCD; (10) computador.



Figura 36: Montagem experimental do sistema Diferencial Raman (In Vitro). No detalhe a montagem do dispositivo responsável pela variação do comprimento de onda do laser de excitação.

Na figura 35 é possível verificar que a configuração adotada para incidir o laser de excitação na amostra foi a de 45°. Isto foi definido com o objetivo de direcionar ao máximo o espalhamento elástico para o infinito, não deixando que ele tenha grandes influências sobre os sinais inelásticos, os quais são capturados pelo sistema telescópio. Faz-se importante ressaltar que esta configuração foi a que obteve melhores resultados dentre inúmeras o utras configurações testadas.

4.1.2.1.1 O TELESCÓPIO

Este dispositivo nada mais é do que uma associação (montagem) de duas lentes, o qual permite transferir o máximo de sinal oriundo da amostra (espalhamentos) para o detector.

O esquema de montagem é bastante simples, como ilustrado na figura 37:



Figura 37: Montagem do telescópio.

Como se pode observar, neste trabalho, o telescópio foi montado utilizando duas lentes bi-convexas idênticas (KBX052). Lembrando-se que a escolha das lentes deve-se a vários motivos dentre eles distâncias focais, f-number, diâmetro da lente, entre outros.

A distância estabelecida entre o porta-amostras e a primeira lente do telescópio foi igual à distância focal das lentes, para que assim, o máximo do sinal espalhado pela amostra fosse capturado pela lente. A distância entre as duas lentes, ficou na realidade dependente da distância focal entre cada uma delas. Como eram lentes iguais, a distância ficou estabelecida em duas vezes a distância focal delas. Já a segunda lente, tem como função focalizar o sinal capturado pela primeira lente na "slit" de entrada do espectrômetro. Para tanto, sua distância com relação ao espectrômetro ficou determinado por sua distância focal. Logo, obedecendo-se as distâncias focais das lentes, pôde-se estabelecer ao certo, as posições de cada um dos componentes desta parte do circuito (porta-amostras, lentes e espectrômetro). Ficando-se então a maior dificuldade na realização do alinhamento entre as lentes. Um filtro notch 830 nm foi introduzido entre as lentes para eliminar qualquer vestígio de espalhamento elástico que possa ter sido capturado pela primeira lente.

Nota-se que uma segunda versão deste telescópio realizada anteriormente com duas lentes plano convexas (KPX100), também apresentou bons resultados e como o sinal capturado pela primeira lente saía colimado em direção a segunda lente, isto permitiu um distanciamento maior entre as lentes. Porém, quanto maior era a distância entre as lente, mais difícil ficava de se realizar o alinhamento final entre as mesmas e da segunda lente para a slit de entrada do espectrômetro. Sendo então adotada a versão com as duas lentes bi-convexas.

4.1.2.2 SISTEMA MACRO-RAMAN IN VIVO

O sistema Macro-Raman "*In Vivo*" é composto por um laser de diodo com cavidade externa sintonizável (Sacher Lasertechnik), com ? = 785 nm, para a excitação das amostras; um cateter óptico para guiar o laser de excitação (porção de excitação) até a amostra, coletar sinal Raman espalhado (porção distal) e por fim, guiar o sinal espalhado até o espectroscópio (porção proximal); um espectrômetro (Pi-Acton SpectraPro, modelo 2500i), equipado com uma câmera CCD detectora, refrigerada por № líquido (PI-Acton Spec-10), usada na captura do sinal espalhado. Por fim, por um computador, no qual serão armazenados e analisados todos os espectros capturados.

A figura 38 mostra o esquema da montagem Macro-Raman "In Vitro" desenvolvido. A figura 39 mostra uma foto da montagem experimental.



Figura 38: Montagem esquemática do sistema Diferencial Raman (In Vivo): (1) laser de excitação; (2) cateter (porção de excitação); (3) cateter (porção distal); (4) porta-amostras; (5) cateter (porção proximal); (6) espectrômetro; (7) câmera CCD; (8) computador.



Figura 39: Montagem experimental do sistema Diferencial Raman (In Vivo). No detalhe superior esquerdo, a porção distal do cateter; no detalhe inferior direito, a porção de excitação do cateter; na indicação central, a porção proximal do cateter, a qual deverá ser acoplada a entrada do espectrômetro.

Não houve uma razão ao certo para a escolha dos lasers em cada um dos dois sistemas, ou seja, não haveria problema algum de utilizar o laser de 785 nm para ao sistema "*In Vitro*" e o laser de 830 nm para o sistema "*In Vivo*".

Em ambos sistemas, foram utilizadas três grades de difração: 300, 600 e 1200 gr /mm. Os experimentos utilizaram o laser de excitação com potências de 15; 45; 80 e 110 mW, com deslocamentos do comprimento de onda (??) de 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5 nm.

É importante lembrar que estes dois circuitos ópticos, não são as únicas possíveis configurações de montagem, ficando em aberto, uma variedade enorme de alterações que podem ser realizadas, afim de se obter uma otimização dos mesmos.

Para efeitos comparativos, foram realizadas medidas em um sistema FT-Raman (Brucker Optics, RFS 100/S), composto por um laser de excitação de Nd:YAG, com ? = 1064 nm (Fig. 40). Para tanto, utilizou-se as mesmas amostras que foram utilizadas nos sistemas Raman dispersivos "*In Vitro*" e "*In Vivo*".



Figura 40: Sistema FT-Raman (RFS 100/S) do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, da Universidade do Vale do Paraíba.

4.2 EXPERIMENTOS COM O SISTEMA ÓPTICO IN VITRO

Os principais parâmetros experimentais pesquisados neste trabalho foram: a influência das diferentes grades de difração; as diferentes potências do laser de excitação e por fim, o tamanho ideal para o deslocamento da linha do laser (ΔI). A figura 41 mostra os espectros Raman de um dente humano, obtidos por um laser de excitação, com diferentes potências de saída (15, 45, 80 e 110 mW), e diferentes grades (300, 600 e 1200 gr./mm). As figuras 41a, 41b e 41c mostram quatro espectros, cada qual, obtidos pelas quatro potências diferentes do laser de excitação

mencionadas anteriormente. Todos os espectros foram normalizados com a intenção de ser representados por uma escala dentro de uma faixa de valores entre 0 e 1, de unidades arbitrárias.

A figura 41a mostra os espectros obtidos com a grade de 300 gr./mm. Esta grade possui uma janela espectral de aproximadamente 1850 cm⁻¹ e resolução de 1,6 cm⁻¹. A figura 41b apresenta os espectros obtidos com a grade de 600 gr./mm. Esta grade possui uma janela espectral de aproximadamente 960 cm⁻¹ e resolução de 0,8 cm⁻¹. Já a figura 41c mostra os espectros obtidos com grade de 1200 gr./mm. Esta grade possui uma janela espectral de aproximadamente 420 cm⁻¹ e resolução de 0,3 cm⁻¹. Estes e outros parâmetros podem ser analisados, através da tabela 8. As três grades apresentaram uma boa relação sinal ruído (S/R), que serão comentadas mais adiante, neste trabalho.



Figura 41: Espectro Raman de um dente humano: a) grade de 300 gr./mm; b) grade de 600 gr./mm e c) grade de 1200 gr./mm. Todas em relação a diferentes potências do laser.

Após investigar parâmetros como o tamanho da janela espectral e resolução de cada uma das três grades utilizadas, o próximo passo foi de verificar os espectros capturados com valores de I diferentes, assim como, com potências diferentes do laser de excitação, em cada uma das três grades utilizadas. A figura 42 ilustra, para

cada uma das grades, quatro espectros capturados (mostrados juntos), com diferentes valores de *I* do laser. O primeiro deles com (*I*) centralizado em 830 nm, já os outros três, ligeiramente deslocados em relação ao primeiro, por valores variando entre: 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5 nm (ΔI). Verifica-se também, o uso de quatro diferentes valores de potência do laser de excitação, medidos na amostra: 15; 45; 80 e 110 mW.

As figuras 42a, 42b, 42c e 42d apresentam, para a grade de 300 gr./mm, os espectros capturados, com as potências do laser de excitação em 15, 45, 80 e 110 mW respectivamente. Já as figuras 42e, 42f, 42g e 42h apresentam, para a grade de 600 gr./mm, os espectros capturados, com as potências do laser de excitação em 15, 45, 80 e 110 mW respectivamente. Por fim, as figuras 42i, 42j, 42k e 42l apresentam, para a grade de 1200 gr./mm, os espectros capturados, com as potências do laser de excitação, com as potências do laser de excitação em 15, 45, 80 e 110 mW respectivamente. Por fim, as figuras 42i, 42j, 42k e 42l apresentam, para a grade de 1200 gr./mm, os espectros capturados, com as potências do laser de excitação em 15, 45, 80 e 110 mW respectivamente.

Para valores muito baixos de potência do laser de excitação (Fig. 42a; Fig. 42e e Fig. 42i), fica difícil a percepção das bandas Raman do espectro do dente, principalmente os diferentes deslocamentos ΔI . Enquanto que para potências maiores do laser de excitação (Fig. 42d; Fig. 42h e Fig. 42l), os deslocamentos dados nos espectros ficam mais evidentes, facilitando suas visualizações.



Figura 42: Espectros de um dente humano: Investigação de diferentes valores l em diferentes potências do laser de excitação, para cada uma das grades utilizadas.

Experimentos foram realizados para a obtenção do melhor valor para o deslocamento do comprimento de onda do laser de excitação (ΔI). Para tanto, foram realizadas subtrações entre o espectro capturado (centralizado em I = 830 nm), com os outros quatro espectros, cada qual deslocado em relação ao primeiro pelos valores de ΔI , apresentados anteriormente.

Os resultados das subtrações dos espectros mostrados na figura 42 estão ilustrados na figura 43, onde é possível verificar, entre outros detalhes, as distorções que ocorrem entre os espectros, devido ao deslocamento (ΔI); independentemente da grade, ou da potência do laser de excitação utilizada. Este fato comprova os efeitos de distorção do sinal apresentados na figura 29. Por exemplo, na figura 43a, é possível ver que para a grade de 300 gr./mm, mantendo a potência do laser fixa em 15 mW, os espectros vão ficando deformados, ao aumentar o valor do deslocamento (ΔI). Isto também ocorre para as outras demais potências: 45; 80 e

100 mW, respectivamente: Fig. 43b; Fig. 43c e Fig. 43d. Assim como, ocorre também para as outras duas grades (Fig. 43 – de (e) até (l)).

Um outro dado importante que a figura 43 apresenta, independentemente da grade ou da potência do laser utilizados, ou ainda do deslocamento (ΔI) dado; é possível realizar a identificação prévia de algumas bandas do espectro final, cuja localização, assim como foi demonstrado na figura 29, é marcada pelo ponto de intersecção entre o sinal (dS(I)) resultante da subtração, com o eixo das abscissas.



Figura 43: Subtração dos espectros. Determinação do melhor valor de (ΔI).

Sendo assim, ficou determinado que o melhor valor escolhido para ΔI para o dente humano, como amostra, seria algo próximo de 0,5 nm. Com este valor, os espectros subtraídos dS(I) não sofrem distorções, ao passo que, com valores superiores ao mesmo os espectros resultantes das subtrações, ficam distorcidos. Impossibilita-se então, a dar continuidade no processo de remoção dos efeitos da luminescência nos espectros, pois com estes resultados distorcidos, mais adiante no final do processo, resultará em um espectro totalmente diferente do esperado. É

importante lembrar de que valores menores de ΔI do que 0,5 nm, também resultam no cancelamento de todo o processo de remoção dos efeitos da luminescência nos espectros.

Segundo a literatura (ZHAO; CARRABA; ALLEN, 2002), o valor ideal para (ΔI) é definido pelo parâmetro FWHM do pico mais intenso de um espectro já conhecido, ou seja, valor este que deverá ser da mesma ordem de grandeza que a largura de linha a meia altura do pico selecionado do espectro já conhecido na literatura. Para o caso do dente humano, o pico selecionado de 961 cm⁻¹, possui o valor de FWHM de aproximadamente 0,5 nm, de acordo com um espectro já conhecido pela literatura (BACHMAN et. al., 2003; BRUGGNERA-JUNIOR et. al., 2007; CHAKRABORTY et. al., 2006; PENEL et. al., 1998; SOARES et. al., 2007b; TSUDA; ARENDS, 1994). Sendo assim, o valor de $\Delta I = 0,5$ nm foi escolhido como o mais adequado para o experimento com os dentes humano.

Mais adiante serão discutidos os parâmetros FWHM encontrados em cada grade utilizada, porém primeiramente, para que se possa dar continuidade no processo de remoção dos efeitos da luminescência nos espectros, antes, faz-se necessário a investigação dos parâmetros M(I), ou seja, a resposta óptica do sistema, de cada uma das três grades utilizadas. Para tanto, foi necessária uma montagem experimental dedicada a obtenção do espectro de corpo negro de uma fonte de luz conhecida (Fig. 44).



Figura 44: Espectro do corpo negro: montagem experimental. No detalhe, a fonte de alimentação da lâmpada. A seta indica o acoplamento da "esfera integradora" com o espectrômetro.

A montagem experimental mostrada na figura 44 é composta por uma fonte de alimentação (Fig. 44-1) de 12V DC / 0.5 A, a qual foi utilizada para fornecer energia
a lâmpada de Tungstênio. Esta lâmpada foi posicionada dentro de uma espécie de cavidade fechada por todos os lados, na qual sua energia luminosa emitida era direcionada para um pequeno e único orifício situado em uma das faces da cavidade. Esse feixe de luz saía colimado e era diretamente direcionado a slit de entrada do espectrômetro. Ou seja, esta lâmpada foi colocada dentro de um espécie de esfera integradora (Fig. 44-2). O sinal oriundo da esfera integradora, era direcionado ao espectrômetro (Fig. 44-3) e este por sua vez, direcionava o sinal resultante para o detector CCD (Fig. 44-4), depois de ter separado este sinal em suas componentes principais. Por fim, o sinal resultante oriundo do espectrômetro, capturado pelo detector CCD, era transmitido a um computador (5), no qual pôde ser analisado sobe a forma de um espectro.

Através da montagem experimental acima, foram capturados três espectros, um para cada uma das três grades, onde cada um deles foi coletado somente na região de nosso interesse, ou seja, foram capturados com as grades centralizadas nas regiões espectrais onde estavam sendo estudadas as amostras biológicas.

De posse destes espectros, pôde-se determinar o parâmetro I_{max} do espectro e segundo a literatura, de posse da "Lei do deslocamento de Wien", equação (31), foi possível determinar a temperatura do corpo negro (HECHT, 2002).

$$I_{max} \cdot T = Cons \tan te \qquad [31]$$

onde:

- I_{max} , representa o valor máximo do espectro de corpo negro medido (m);
- T, representa a temperatura do corpo negro (K);
- Constante (constante de dispersão de Wein) = 2,898x10⁻³ (mK).

Segundo nossos dados coletados, o valor de $I_{máx}$ foi em 953 nm, resultando em um valor de T = 3040 (K), para a temperatura do corpo negro estudado. Com este resultado, e através da 'Lei da Radiação de Planck'', demonstrada pela equação (32), foi possível elaborar a curva teórica do espectro de radiação de corpo negro, podendo ser utilizada para comparação com a curva medida no experimento (EISBERG; RESNICK, 1979).

$$I(\mathbf{1}) = \frac{8\mathbf{p}hc}{\mathbf{1}^5} \cdot \left[\frac{1}{\left(e^{\left(\frac{hc}{\mathbf{1}K_BT}\right)} - 1\right)}\right]$$
[32]

onde:

- $I(\mathbf{l})$, representa o espectro teórico do corpo negro;
- h (constante de Planck);
- c (velocidade da luz no vácuo);
- K_B (constante de Boltzmann);
- T, representa a temperatura do corpo negro em questão.

Sendo assim, pôde-se elaborar as medidas dos espectros de corpo negro para as três grades. Na figura abaixo é possível ver uma comparação entre os valores medidos e os valores teóricos, para cada grade utilizada, dos espectros do corpo negro.



Figura 45: Espectros do corpo negro (Valores medidos / Valores teóricos).

Através destes dados, e segundo a equação (23), mostrada anteriormente, pôde-se determinar o valor do parâmetro M(I), o qual será utilizado para dar continuidade ao processo de remoção dos efeitos da luminescência nos espectros. O parâmetro M(I) será apresentado na forma invertida, ou seja, $M^{-1}(I)$, tornando-se mais fácil a resolução da equação (26), a qual irá finalizar o processo da remoção da fluorescência dos espectros (Fig. 46).



Figura 46: Investigação dos parâmetros $M^{-1}(\mathbf{1})$ para cada grade.

A figura 46 mostra os parâmetros $M^{-1}(1)$ para cada uma das três grades usadas. Observa-se que os espectros que estão sendo mostrados pelo Painel II (a, e c), representam respectivamente os mesmos espectros apresentados pelo Painel I (a, b e c), porém de forma ampliada, as regiões de interesse. Nota-se que nos três casos, para as regiões de interesse para a aquisição de espectros (de 900 a 1200 cm⁻¹) destas amostras biológicas, as mesmas regiões podem ser consideradas praticamente lineares, o que implica dizer que não modificará muito, a resposta final do processo. Porém, deve-se ressaltar que de acordo com a figura 46, é evidente que a grade de 300 gr./mm apresentou melhores resultados, seguido pela grade de 600 gr./mm e por último a grade de 1200 gr./mm.

Os parâmetros característicos de cada grade, investigados pelos experimentos realizados até aqui e a amostra a ser estudada, compõem os principais fatores que determinarão a escolha da grade de que será utilizada. Faz-se necessário ressaltar que esta escolha parte das análises individuais (para cada grade), de todos estes parâmetros, assim como da comparação entre os mesmos.

A partir destes resultados é possível concluir que a grade de 600 gr./mm é a mais adequada para o uso. Esta decisão partiu devido ao fato da mesma apresentar características intermediárias entre as três grades testadas. Esta grade possui uma boa performance em resolução espectral (0,8 cm⁻¹); uma janela espectral com um tamanho razoavelmente bom (960 cm⁻¹); um fator intermediário de FWHM (25 cm⁻¹); o melhor parâmetro sinal/ruído RMS (0,434). Se comparada às grades de 300 gr./mm e de 1200 gr./mm. Estes dados podem ser comparados analisando-se a tabela 7. Os parâmetros FWHM e relação sinal/ruído RMS, serão discutidos mais adiante, neste trabalho.

Já para o experimento do sistema "*In Vivo*", foi utilizada a grade de 300 gr./mm, devido ao fato de apresentar uma maior linearidade no parâmetro $M^{-1}(I)$, mas, principalmente, devido à ampla largura da janela espectral. Permitindo-se assim, que mais bandas espectrais pudessem ser estudadas.

Depois de adquirido todos estes parâmetros experimentais de calibração do sistema, o processo de remoção dos efeitos da luminescência nos espectros pôde ser continuado, resultando-se assim, nos seguintes espectros:



Figura 47: Espectro final $R(\mathbf{1})$: Colunas: grades de 300, 600 e 1200 gr./mm, respectivamente. Linhas: de (a) à (d); de (e) à (h) e de (i) à (l), variação de potência do laser (15, 45, 80 e 110 mW, respectivamente).

A figura 47 mostra os espectros finais obtidos do experimento "In Vitro", com o dente humano, como amostra biológica estudada. Nesta mesma figura foram tirados alguns parâmetros que contribuíram para a escolha final da grade em cada um dos dois sistemas montados. Sendo eles: o parâmetro FWHM e a relação sinal ruído, para cada uma das três grades, apresentados juntamente com outros parâmetros, já comentados anteriormente, na tabela 7:

Grade [gr./mm]	300	600	1200
FWHM (RMS) [cm ⁻¹]	35	25	18
S/N (RMS)	0,373	0,434	0,371
Janela espectral [cm ⁻¹]	1850	960	420
Resolução [cm ⁻¹]	1,6	0,8	0,3

 Tabela 7: Parâmetros de caracterização das grades de 300, 600 e 1200 gr./mm.

Algumas considerações devem ser feitas sobre todos os resultados adquiridos. A primeira delas é a respeito das diferenças de espectros devido as diferentes resoluções espectrais das três grades, como era de se esperar a grade de 1200 gr./mm apresentou espectros mais estreitos, devido a maior resolução espectral; seguida pelas grades de 600 e depois pela de 300 gr./mm. A segunda consideração é a respeito das diferentes potências do laser de excitação utilizadas em cada uma das três grades e o nível de ruído inserido nos sinais. Fica evidente nestes espectros, para qualquer uma das três grades (colunas), quando se analisa os espectros com diferentes potências da fonte de excitação (linhas), verifica-se que, com o aumento da potência do laser o nível de ruído sobre os espectros, diminui muito. A terceira diz respeito aos valores diferentes de ΔI , ocasionando distorções nos espectros finais ($\Delta I > 0.5$ nm), conforme já foi comentado anteriormente. A quarta consideração diz respeito ao parâmetro FWHM obtidos nos espectros finais de cada uma das três grades, sendo o melhor dele é claro o da grade de 1200 gr./mm, seguido da grade de 600 gr/mm e por fim, da grade de 300 gr./mm; o que já era esperado, devido ao parâmetro de resolução espectral das três grades. Por fim, como ultima consideração tem-se os valores obtidos das relações sinal/ruído RMS em cada grade, devendo-se lembrar de que a grade de 600 gr./mm teve o melhor resultado, seguido da grade de 300 gr./mm e depois pela grade de 1200 gr./mm.

Um fato importante a ser levantado é explicar a razão pela qual entre as etapas de subtração dos espectros (Fig. 43) e integração dos espectros (Fig. 47), o ruído residual sobre os espectros diminuiu muito, praticamente chegando-se a se extinguir.

Este fato pode ser explicado através das equações (24) e (26):

$$dS(\mathbf{l}) = dR(\mathbf{l}) \cdot M(\mathbf{l})$$
$$R(\mathbf{l}) = \int [dS(\mathbf{l}) \cdot M^{-1}(\mathbf{l})] d\mathbf{l}$$

Onde, mesmo após eliminar a resposta do sistema óptico M(I) do sinal diferencial dS(I), existe ainda, um pequeno ruído N(I), associado ao sinal Raman puro Rp(I), contido nos sinal diferencial Raman dR(I), podendo ser escrito pela equação (33):

$$dR(\mathbf{l}) = Rp(\mathbf{l}) \cdot N(\mathbf{l})$$
 [33]

Sendo assim, ao realizar a integração feita pela equação (26), na realidade estará sendo feito o processo apresentado na equação (34):

$$R(\mathbf{l}) = \int [dS(\mathbf{l})] d\mathbf{l}$$
$$R(\mathbf{l}) = \int [Rp(\mathbf{l}) \cdot N(\mathbf{l})] d\mathbf{l}$$
[34]

Onde, através da utilização de integração por partes, chega-se na equação (35):

$$R(\mathbf{I}) = R_p(\mathbf{I}) \int N(\mathbf{I}) d\mathbf{I} - \int \left\{ \int N(\mathbf{I}) d\mathbf{I} \right\} \frac{dR_p(\mathbf{I})}{d\mathbf{I}} d\mathbf{I}$$
[35]

Sendo assim, pode-se perceber um desencadeamento de sucessivas integrações do ruído $N(\mathbf{l})$ o que faz com que o nível do mesmo seja menor a cada integração. Estes processos não são tão evidentes devido ao fato de todas as operações matemáticas elaboradas com os espectros terem sido feitas através do software OriginPro 7.0 (Origin Lab. Corporation). Assim como, os cálculos dos parâmetros das relações sinal/ruídos (RMS) apresentados, foram elaborados com o auxílio do software OPUS 4.2 (Bruker Optik GmbH).

A figura 48 mostra, de maneira resumida, todas as etapas (a, b, c) do processo de remoção da fluorescência dos espectros Raman, utilizando-se como amostra o dente humano.

Ainda nesta mesma figura, pode-se observar uma comparação feita entre o resultado obtido com o sistema *"In Vitro"*, comparado ao resultado obtido por um sistema FT-Raman (Bruker Optics).



Figura 48: Espectro Diferencial Raman: dente Humano. Etapas: a) Aquisição dos espectros; b) Subtração dos espectros; e c) Integração do espectro subtraído e resultado final. Ainda em (c), comparação de resultados entre o d sistema In Vitro e do sistema FT-Raman.

Ainda na figura 48c, é possível verificar a presença de algumas bandas Raman mais relevantes como por exemplo: a banda em 961 cm⁻¹, referente ao fosfato ($PO_4^{3^-}$) e a banda em 1073 cm⁻¹, referente ao carbonato ($CO_3^{2^-}$); todos contidos na hidroxiapatita encontrada na dentina dos dentes.

4.3 EXPERIMENTOS COM O SISTEMA ÓPTICO IN VIVO

Os procedimentos utilizados para a remoção dos efeitos da fluorescência sobre os espectros Raman das amostras serão realizados de maneira idêntica a do sistema "*In Vitro*", ou seja, todas as etapas seguirão a mesma metodologia apresentada anteriormente.

Como foi dito anteriormente, para as análises do sistema "*In Vivo*", foram utilizadas duas amostras biológicas diferentes. A primeira amostra (pele do dedo humano) foi analisada a partir da ponta do dedo indicador de um membro colaborador do grupo de estudo em questão. Já a segunda amostra, referencia-se a pele de uma das mamas de uma ratinha de laboratório Sprague-Dawley. Basicamente, as duas amostras tiveram uma higienização local e depois foram expostas diretamente ao lazer de excitação, através da porção distal do cateter do sistema "*In Vivo*". Aqui, vale a pena mencionar, mais uma vez de que, o laser de excitação que fora utilizado neste sistema tinha I = 785 nm.

As figuras 49 e 50 mostram os resultados obtidos com o sistema "In Vivo".



Figura 49: Espectro Diferencial Raman: dedo Humano (pele). Etapas: a) Aquisição dos espectros; b) Subtração dos espectros; e c) Integração do espectro subtraído e resultado final. Ainda em (c), comparação de resultados entre o d sistema In Vivo e do sistema FT-Raman.

Ainda na figura 49c, é possível verificar a presença de algumas bandas Raman mais relevantes como por exemplo: a banda em 1650 cm⁻¹, referente a vibração (stretch) dada pela ligação C=O, representando o pico de Amida I; as bandas próximas de 1335 cm⁻¹ e 1440 cm⁻¹, referentes as vibrações dada pela ligação CH₂, representando lipídios e proteínas contidas na amostra.



Figura 50: Espectro Diferencial Raman: mama (pele) de uma rata de laboratório Sprague-Dawley. Etapas: a) Aquisição dos espectros; b) Subtração dos espectros; e c) Integração do espectro subtraído e resultado final. Ainda em (c), comparação de resultados entre o d sistema In Vivo e do sistema FT-Raman.

Ainda na figura 50c, é possível verificar a presença de algumas bandas Raman mais relevantes como por exemplo: a banda em 1065 cm⁻¹, referente a vibração (stretch) dada pela ligação C-N; a banda próxima de 1314 cm⁻¹, referente a deformação dada pela ligação CH; a banda próxima de 1440 cm⁻¹, referente as vibrações dada pela ligação CH₂, representando lipídios e proteínas contidos na amostra; a banda próxima de 1660 cm⁻¹, referente as vibrações (stretch) dada pela ligação LH₂, representando lipídios e proteínas contidos na amostra; a banda próxima de 1660 cm⁻¹, referente as vibrações (stretch) dada pela ligação C=O, representando Amida I, também contidos na amostra.

Ambos espectros resultantes do sistema "*In Vivo*" (Fig. 49c e 50c), e até mesmo o do sistema "*In Vitro*" (Fig. 48c), indicam que a metodologia Diferencial Raman, quando aplicada a um sistema dispersivo Raman, possibilita a remoção satisfatória dos efeitos da fluorescência sobre os espectros Raman das amostras. Os resultados obtidos são muito próximos ao obtido em um sistema FT-Raman.

5 CONCLUSÃO

Foi possível a remoção satisfatória dos efeitos da luminescência (fluorescência), de espectros Raman de amostras biológicas, obtidos através de um sistema Raman dispersivo, utilizando-se a técnica de Espectroscopia Raman Diferencial. Os resultados obtidos condizem com os resultados apresentados em alguns trabalhos na literatura, como por exemplo, o de ZHAO, em 2002; o de MOISER-BOSS, em 1995; entre outros. Características de deformação do sinal devido, entre outros diferentes fatores, como a da aquisição de espectros deslocados, entre si, por um valor de (ΔI) muito grande, puderam ser completamente comprovadas. Técnicas de medidas ou até através da análise de espectros já conhecidos, também puderam ser comprovadas.

Uma grande vantagem apresentada neste trabalho diz respeito à metodologia empregada na realização da técnica, a qual se diferencia um pouco das demais apresentadas na literatura, por poder ser realizada quase que por completa, com a utilização apenas de um software, tornando-se mais simples e rápida, se comparada aos processos onde cada etapa é matematicamente resolvida por vez.

A técnica de Espectroscopia Raman Diferencial vem mostrando ser eficiente e vantajosa, quando comparada à técnica de espectroscopia FT-Raman, devido ao fato da mesma gastar menos tempo para realizar as aquisições dos espectros, possuir uma boa relação custo / benefício e principalmente, poder ser implementada em um sistema óptico mais compacto. Além de permitir o uso de diferentes ? de lasers, sem que haja mudanças muito significativas no circuito óptico do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A. **The Raman effect: Applications**. New York: Marcel dekken, 1973. 630 p.

ANDRADE, P. O.; BITAR, R. A.; YASSOYAMA, K.; MARTINHO, H. S.; SANTO, A. M. E.; BRUNO, P. M.; MARTIN, A. A. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman sepctroscopy. **Anal. And Bioanal. Chem.,** v.387, p.1643-1648, 2007.

BACHMANN, L; DIEBOLDER, R; HIBST, R AND ZEZELL, D. M. Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.38, n.1, p.1-14, 2003.

BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E.N.K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PNOTTI, J. A. Induction Of Experimental Mammary Carcinogenesis In Rats With 7,12-Dimethylbenz (A) Anthracene. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med.**, v.59, p.257-261, 2004.

BARSBERG, S; MATOUSEK, P AND TOWRIE, M. Structural analysis of lignin by resonance Raman spectroscopy. **Macromol Biosci**, v.5, n.8, p.743-52, 2005.

BELL, S. E. J.; BOURGUIGNON, E. S. O.; DENNIS, A. Analysis of luminescent samples using subtracted shifted Raman spectroscopy. **Analyst**, v.123, p. 1729-1734, 1998.

BITAR, R. A.; MARTINHO, H. S.; CRIOLLO, C. T.; RAMALHO, L.; NETTO, M.; MARTIN, A. A. Biochemical analisys of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.11, p.054001, 2006.

BRUGNERA-JUNIOR, A.; SOARES, L. E.; ZANIN, F. A. A.; REZENDE, E. B.; JARA, W. A. A.; MARTIN, A. A. Combined FT-Raman and SEM Studies of Teeth Manipulation Treatments and Er:YAG Laser Irradiation on Dentin. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 25, p. 239-244, 2007.

CARDEN, A AND MORRIS, MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralised tissues (review). **J Biomed Opt**, v.5, n.3, p.259-68, 2000.

CHAKRABORTY, S.; BAG, S.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K. Structural and microstructural characterization of bioapatites and synthetic hydroxyapatite using X-ray powder diffraction and Fourier transform infrared techniques. **J. Appl. Cryst.**, v.39, p.385-390, 2006.

DEMTRÖDER, W. Laser spectroscopy: basic concepts and instrumentation. 2. ed. N.Y.: Springer, 1996.

EFREMOV, EV; BUIJS, JB; GOOIJER, C AND A RIESE, F. Fluorescence rejection in resonance Raman spectroscopy using a picosecond-gated intensified charge-coupled device camera. **Appl Spectrosc**, v.61, n.6, p.571-8, 2007.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. São Paulo: Campus / Elsvier, 1979. 936p.

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. Introductory raman **Spectroscopy**. 2. ed. San Diego, USA: Academic Press. 2003. 434p.

GRIOT, M.: banco de dados. Disponível em: < http://www.mellesgriot.com/products/default.asp >. Acesso em: 12 ago. 2006.

HECHT, E. Óptica. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 790p.

HECHT, J. The Laser Guidebook. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, Inc., 1992. 498p.

IBACH, H.; LÜTH, H. Solid-State Physics an Introduction to theory and experiment. Springer-Verlag, 1993.

KARTTUNEN, H.; KRÖGER, P.; OJA, H.; POUTANEN, M.; DONNER, J. K. **Fundamental Astronomy**. 3. ed. Berlin, Germany: Springer, 1996. 521p.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore, USA: Springer, 2006. 954p.

LOEWEN, E. G. **Diffraction gratings and applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. 601p.

MARTIN, A. A.; OLIVEIRA, A. P.; SIVEIRA-JUNIOR, L.; ZANGARO, R. A. Application of principal components analysis to diagnosis hamster oral carcinogenesis: Raman study. **Biomedical Vibrational Spectroscopy/Biohazard Detection Technologies, Estados Unidos,** v. 5321, n. 4, p. 111-116, 2004.

MARZULLO, A. C. M. ; PINTO NETO, O. ; BITTAR, R. A. ; MARTINHO, H. ; MARTIN, A. A. FT Raman Spectra of the border of infiltrating ductal carcinoma lesions. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 25, p. 455-460, 2007.

MATOUSEK, P.; TOWRIE, M.; PARKER, A. W. Fluorescence Suppression in Resonance Raman Spectroscopy using Combined Kerr Gated and SERDS Technique and Automated Spectrum Reconstruction. **Central Laser Facility,** Annual Report, p.195-197, 2002.

MOSIER-BOSS, P.A.; LIEBERMAN, S. H.; NEWBERY, R. Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection, and FFT Filtering Techniques. **Applied Spectroscopy**, v.49, n.5, p.630-8, 1995.

NEWPORT: banco de dados. Disponível em: < http://www.newport.com/default.aspx?lang=1033 >. Acesso em: 27 out. 2006.

NUNES, L. O.; MARTIN, A. A.; SLVEIRA-JUNIOR, L.; ZAMPIERI, M. FT-Raman Spectroscopy study for skin cancer diagnosis. **Applied Spectroscopy**, v. 17, p. 597-602, 2003.

OJEDA, J.; XIE, C.; LI, Y.; BERTRAND, F.; WILLEY, J.; MCCONNELL, T. Chromosomal analysis and identification based on optical tweezers and Raman spectroscopy. **Optical Express**, v.14, n.12, p.5385-5393, 2006.

OLIVEIRA, A. P. ; BITTAR, R. A. ; SIVEIRA JUNIOR, L. ; ZANGARO, R. A. ; MARTIN, A. A. Near Infrared Raman Spectroscopy for Oral Carcinoma Diagnosis. **Photomedicine and Laser Surgery,** v. 24, n. 3, p. 348-353, 2006.

O'SHEA, D. C.; BARTLETT, M. L.; YOUNG, R. A. Compositional analysis of apatites with laser-raman spectroscopy: (oh, f, cl) apatites. **Arch Oral Biol,** v.19, n.11, p.995-1006, 1974.

OSHIMA, Y.; KOMACHI, Y.; FURIHATA, C.; TASHIRO, H.; SATO, H. Fluorescence-Suppressed Raman Technique for Quantitative Analysis of Protein Solution Using a Micro-Raman Probe, the Shifted Excitation Method, and Partial Least Squares Regression Analysis. **Applied Spectroscopy**, v.60, n.9, p.964-970, 2006.

PALMER, C. **Diffraction Grating Handbook**. 6. ed. New York: Newport Corporation, 2005. 265 p.

PENEL, G.; LEROY, G.; REY, C.; BRES. E. Micro Raman Spectral Study of the PO₄ and CO₃ Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites. **Calcif Tissue Int**, v.63, p. 475-481, 1998.

PENTEADO, S.; LOBO, A. O.; MARTIN, A. A.; MARTINHO, H. Rotator Cuff Lesions: A Biochemical Study Probed by FT-Raman Spectroscopy. In: SPEC2006: Shedding Light on Disease, 2006, Heidelberg. Optical Diagnosis for the New Millennium, 2006. v. 1. p. 125.

PERSSON, B. N.; ZHAO, K.; ZHANG, Z. Chemical contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Phys Rev Lett**, v.96, n.20, p.207401, 2006.

RAMSER, K.; ENGER, J.; GOKSÖR, M.; HANSTROP, D.; KÄLL, M. A microfluidic system enabling Raman measurements of the oxygenation cycle in single optically trapped red blood cells. **Royal Society of Chemistry**, v.5, 2005.

SACHER LASERTECHNIK GROUP: banco de dados. Disponível em: < http://www.sacher-laser.com/littrow.php >. Acesso em: 18 nov. 2006.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 223 p.

SEMROCK: banco de dados. Disponível em: < http://www.semrock.com/CatalogProducts_by_Application.htm >. Acesso em 01 des. 2007.

SHREVE, A.P.; CHEREPY, N. J.; MATHIES, R. A. Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique. **Appl Spectrosc**, v.46, n.4, p.707-11, 1992. SOARES, L. E. S.; MARTIN, A. A.; JUNIOR, A. B.; ZANIN, F. A. A.; ARISAWA, E. A.; PACHECO, M. T. Raman study of human dentin irradiated with Er:YAG laser. **Proc.** of **SPIE**, v.5610, p.249-257, 2003.

SOARES, L. E. S.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F. A.; PACHECO, M. T.; MARTIN, A. A. Effects of treatment for manipulation of teeth and Er:YAG laser irradiation on dentin: a Raman spectroscopy analysis. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.1, p.50-7, 2007a.

SOARES, L. E. S.; RESENDE, E. B. P. S.; JUNIOR, A. B.; ZANIN, F. A. A.; MARTIN, A. A. Combined FT-Raman and SEM Studies of the Effects of Er: YAG Laser Irradiation on Dentin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.4, p.239-244, 2007b.

STEEN, W. M. Laser Material Processing. London: Springer-Verlag, 1991. 266p.

TANG, W.; NEWTON, R. J.; XIE, C. A.; LI, Y. Q.; WHITLEY, N. Non-destructive Analysis of the Nuclei Transgenic Living Cells Using Laser Tweezers and Near-Infrared Raman Spectroscopy Techinique. **Geno. Prot. Bioinfo.,** v.3, n.3, p.169-178, 2005.

TRACEWELL, C. A.; CUA, A.; STEWART, D. H.; BOCIAN, D. F.; BRUDVIG, G. W. Characterization of carotenoid and chlorophyll photooxidation in photosystem II. **Biochemistry**, v.40, n.1, p.193-203, 2001.

TSUDA, H.; ARENDS, J. Orientational Micro-Raman Spectroscopy on Hydroxyapatite Single Crystals and Human Enamel Crystallites. **J Dent Res**, v.73, n.11, p.1703-10, 1994.

VERDEYEN, J. T. Laser Electronics. 3. ed. Englewood cliffs: Prentice Hall, 1995. 778p.

XIE, C.; LI, Y. Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techiniques. **J. Appl. Phys.,** v.93, n.5, p.2982-2986, 2003.

XIE, C.; MACE, J.; DINNO, M. A.; LI, Y. Q.; TANG, W.; NEWTON, R. J.; GEMPERLINE, P.J. Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solutions Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscoppy. **Anal. Chem.,** v.77, p.4390-4397, 2005.

YOUNG, M. **Óptica e Lasers**. ponta 15. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1998. 439p.

ZHAO, J.; CARRABBA, M. M.; ALLEN, F. S. Automated Fluorescence Rejection Using Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.56, n.7, p.834-845, 2002.