



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JOÃO MARCOS FÁVARO LOPES

**ANÁLISE ELEMENTAR POR TXRF DE AMOSTRAS DE SALIVA DE
PACIENTES COM PERI-IMPLANTITE**

LONDRINA

2022

JOÃO MARCOS FÁVARO LOPES

**ANÁLISE ELEMENTAR POR TXRF DE AMOSTRAS DE SALIVA DE
PACIENTES COM PERI-IMPLANTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Física da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello

**LONDRINA
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L864a Lopes, João Marcos Fávaro.
 Análise elementar por TXRF de amostras de saliva de pacientes com peri-implantite / João Marcos Fávaro Lopes. - Londrina, 2022.
 100 f. : il.

 Orientador: Avacir Casanova Andrello.
 Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2022.
 Inclui bibliografia.

 1. Fluorescência de Raios X - Tese. 2. Análise Elementar - Tese. 3. Peri-Implantite - Tese. 4. Saliva - Tese. I. Andrello, Avacir Casanova. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

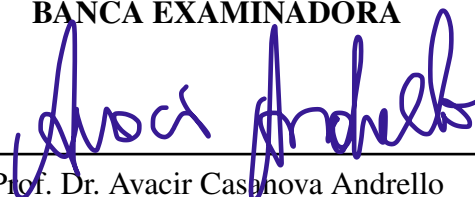
CDU 53

JOÃO MARCOS FÁVARO LOPES

**ANÁLISE ELEMENTAR POR TXRF DE AMOSTRAS DE SALIVA DE
PACIENTES COM PERI-IMPLANTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Física da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Física.

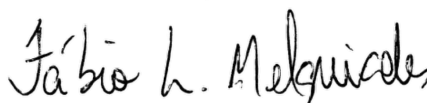
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dr. Eduardo Inocente Jussiani
Universidade Estadual de Londrina – UEL



Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de julho de 2022.

AGRADECIMENTOS

De início gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello por ter aceitado me orientar ao longo desses dois anos de mestrado e pela amizade desenvolvida. Seu conhecimento, dedicação e paciência foram fundamentais para a realização deste trabalho e meu desenvolvimento como mestre em Física.

Ainda no âmbito acadêmico, gostaria de agradecer a todos os membros do Grupo de Física Nuclear Aplicada da UEL pela recepção e hospitalidade. Mesmo não conhecendo ninguém de antemão, caí de paraquedas na UEL e me senti muito bem vindo e acolhido no grupo. Faço uma menção especial aos professores Dr. Eduardo Inocente Jussiani e Dr. Fábio Luiz Melquiades por todas as conversas, conselhos e conhecimentos transmitidos nas disciplinas que me foram ministradas ao longo do mestrado.

Caminhando para um lado mais pessoal, não seria possível realizar este trabalho sem o apoio, incentivo e paciência da minha namorada, Aiya, dos meus pais, Maria Regina e Silvio, e da minha irmã, Rafaela.

Agradeço também a meus grandes amigos da graduação: Lucas Maquedano e Pedro Haerter. Desde as conversas mais banais sobre como "ta tudo caro", até discussões fundamentais sobre nossas dissertações e ensaios de seminários.

Outras duas "pessoas" que merecem um agradecimento especial são meus gatos, Mimi e Yoda, por me proporcionarem um descanso das obrigações do mestrado quando necessário e servirem de plateia para inúmeros ensaios e estudos.

Também devo agradecer ao Dr. Ítalo Vitorino e seus pacientes que concordaram em fornecer amostras para estudo e realização deste trabalho. Literalmente, a confecção deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração dessas pessoas.

Não poderia faltar também um agradecimento para Alexandra Elbakyan, a fundadora do *Sci-Hub*, pela sua luta pela divulgação da ciência e o livre acesso ao conhecimento.

Por fim agradeço à CAPES, ao CNPq e ao INCT-FNA pelo apoio financeiro.

Fazer o capítulo de agradecimentos de um trabalho deste tamanho é provavelmente tão difícil quanto escrever a fundamentação teórica. Claro que o conteúdo da fundamentação é bem mais extenso, mas acho que não existe o risco de magoar o Röntgen ao esquecer de mencionar alguma de suas contribuições para o desenvolvimento da teoria dos raios X, enquanto a possibilidade de deixar algum amigo chateado por não mencioná-lo é bastante grande. Não sei qual a validade do capítulo de agradecimentos de uma dissertação de mestrado como contrato, mas me comprometo a pagar uma cerveja para quem comprovar que me ajudou de alguma maneira e esqueci de mencionar.

*"Afirmar que se detém o conhecimento
absoluto é se tornar monstruoso. O
conhecimento é uma aventura interminável na
borda da incerteza."
- Frank Herbert (Duna).*

LOPES, J. M F.. **Análise Elementar por TXRF de Amostras de Saliva de Pacientes com Peri-Implantite**. 2022. 99f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A análise de fluídos biológicos é utilizada para detecção de doenças e avaliar a qualidade de tratamentos médicos e odontológicos. Nesse contexto, os principais fluídos biológicos analisados são o sangue, a urina e a saliva. Amostras de saliva são particularmente adequadas para avaliar a saúde bucal por meio da composição elementar do fluído. Uma doença bucal particularmente comum é a peri-implantite, que afeta usuários de implantes dentários. Tais implantes assemelham-se a parafusos, normalmente feitos de titânio, e são fixados na mandíbula de pessoas edêntulas para servir de suporte para próteses. Causada por ação bacteriana, essa doença é caracterizada pela inflamação da gengiva, seguida de corrosão do implante e, em casos mais severos, a perda da estrutura óssea que sustenta o implante. O objetivo deste trabalho é, portanto, o de examinar a composição elementar de amostras de saliva coletadas de pacientes acometidos por peri-implantite e buscar uma relação entre os elementos detectados e a presença da doença, utilizando a Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF). Para a realização deste estudo foram coletadas quatro amostras de onze pacientes distintos, que foram separados em três grupos: (i) um grupo de quatro pessoas onde foram coletadas amostras de diferentes regiões da boca; (ii) um grupo de três pessoas onde foram coletadas amostras de diferentes regiões de um implante que foi perdido para a ação da doença; (iii) um grupo de três pessoas onde foram coletadas amostras de saliva diferentes regiões da boca e do implante, além de uma amostra de tecido gengival em cada um dos paciente; (iv) um paciente sem peri-implantite mas que faz uso de implantes onde foram coletadas amostras de saliva em sulcos implantares saudáveis. A medida das amostras foi feita utilizando o espectrômetro de bancada S2 PICOFOX da Bruker Nano, e os espectros obtidos foram analisados pelo software Spectra 7. Os principais elementos medidos nas amostras de saliva foram: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Co, Ni, Zn, As, Se, Br e Rb. Além destes ainda foram encontrados V, Mn, Cu, Zr e Ba em algumas das amostras. Analisando os dados do primeiro grupo foi possível notar que os principais elementos relacionados com a doença são o ferro, o cloro e o enxofre. A presença dos dois primeiros elementos estão relacionados à resposta do organismo para a infecção, e o terceiro é considerado um produto da presença das bactérias. Com base nesses resultados foi possível estimar, para o segundo grupo, em qual região do implante a infecção estava mais aguda ao encontra a região com maior presença destes três elementos. Com os resultados obtidos no terceiro grupo, foi possível verificar que o titânio corroído dos implantes é absorvido pela gengiva, e não liberado na saliva. Além da análise individual, a análise de componentes principais (PCA) para os dados de contagem permitiu identificar uma separação entre os grupos de coleta em função do titânio corroído dos implantes. Entre as amostras do primeiro grupo, há uma tendência de agrupamento para as amostras coletadas de sulcos acometidos por peri-implantite em função do elementos ferro, cloro e enxofre. Com os resultados obtidos, fica claro que a TXRF é uma técnica adequada para análise de amostras de saliva e há indícios de que a técnica possa ser utilizada para fazer diagnósticos de peri-implantite.

Palavras-chave: TXRF. Peri-implantite. Saliva.

LOPES, J. M F.. **Elemental Analysis using TXRF of Saliva Samples of Patients with Peri-Implantitis**. 2022. 99p. Master's Thesis (Master in Physics) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Biological fluid analysis is widely applied to detect diseases and evaluate the quality of medical e dental treatments. In this context, the main biological fluids analyzed for this goal are blood, urine and saliva. Saliva samples are particularly adequate do evaluate oral health by it's elemental composition. A oral disease that's fairly common is peri-implantitis, a disease that affects people who have dental implants in their mouths. Those implants resembles crews, usually made out of titanium, and are fixated to the patient's jaw to replace missing teeth and play the role of root for dental prosthesis. The disease is caused by bacteria and is characterized by gum inflammation, followed by implant corrosion and, in more severe cases, loss of bone tissue from the jaw. This thesis' goal is, therefore, to examine de elemental composition of saliva samples collected from patients that suffer from peri-implantitis and search for a relation between the de detected elements and the disease's presence by utilizing the Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) technique. To perform such analysis, four samples from eleven patients were collected divided among three groups: (i) a group of four people where the samples were collected from different regions of the individual's mouth; (ii) a group of three people where the samples were collected from different regions of a implant that was lost due to the infection; (iii) a group of three people where the samples were collected from different regions of the individual's mouth and from a implant, besides a sample collected from gum tissue; (iv) one patient that didn't show signs of peri-implantitis where the samples were collected from healthy implant sulcus. The data collection was performed using a benchtop spectrometer S2 PICO-FOX by Bruker Nano, and the obtained spectra was analyzed using the Spectra 7 software. The main elements detected over the samples were: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Co, Ni, Zn, As, Se, Br and Rb. Besides these, V, Mn, Cu, Zr and Ba were also detected but on a very small amount of samples. By analyzing the data collected from the first group it was possible to notice that the main elements related to the disease are iron, chlorine and sulfur. The presence of the first two are related to the organism's reaction to the infection, and the third one is an effect of the bacteria presence. Based on theses results it was possible to estimate, on the second group, on which region of the lost implant the infection was more severe by finding on which region the presence of iron, chlorine and sulfur was higher. The results obtained for the third group showed that titanium's presence is higher on gum tissue than on saliva itself, which indicates that the particles corroded by the implant are absorbed on the gum. Beyond the individual analysis for each patient, the principal component analysis (PCA) was also performed and showed a clear separation between the samples from each group. Among the samples collected for the first group, the biplot indicated a tendency of grouping for the samples collected from gingival sulcus affected by peri-implantitis in function of iron, chlorine and sulfur. With the obtained results it is clear that the TXRF is an adequate technique to analyze saliva samples and there is evidence that the technique can be used to perform peri-implantitis diagnosis.

Keywords: TXRF. Peri-implantitis. Saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquematização de uma onda eletromagnética.	16
Figura 2 – Ilustração do espectro eletromagnético.	17
Figura 3 – Tubo de raios catódicos e radiografia da mão da esposa de Röntgen.	19
Figura 4 – Emissão de raios X por meio de efeito fotoelétrico.	20
Figura 5 – Experimento realizado por Compton para verificar o espalhamento Compton. Raios X monocromáticos de comprimento de onda λ atingem o espalhador e são espalhados de acordo com um ângulo θ	22
Figura 6 – Espectros observados para o experimento de Compton para diversos ângulos de espalhamento.	22
Figura 7 – Esquematização do efeito Compton.	23
Figura 8 – Esquematização do espalhamento Rayleigh.	24
Figura 9 – Geometria básica de um tubo de raios X.	26
Figura 10 – Possíveis orbitais atômicos em função do valor do número quântico azimutal.	27
Figura 11 – Esquema de transições permitidas entre sub-níveis eletrônicos.	28
Figura 12 – Etapas básicas da análise por XRF.	32
Figura 13 – Possíveis comportamentos observados para um feixe monoenergético incidente sobre uma superfície em função do ângulo crítico.	33
Figura 14 – Esquema geométrico básico de um espectrômetro de TXRF.	33
Figura 15 – Comparação esquemática entre dente e implante.	35
Figura 16 – Ilustrações de dois tipos de implantes de titânio: de peça única e composto.	37
Figura 17 – Organização de uma matriz de dados para análise de espectros.	41
Figura 18 – Exemplo de redução dimensional pela aplicação da PCA.	43
Figura 19 – Película protetora do disco sendo retirada e porta-amostra sobre suporte de preparação	46
Figura 20 – Regiões de coleta em sulco peri-implantar.	49
Figura 21 – Localização da glândula parótida e o duto que leva a saliva produzida até a boca.	49
Figura 22 – Regiões de coleta de amostra em implantes.	49
Figura 23 – Micropipeta com ponta estéril descartável semelhante à utilizada para coleta das amostras.	50
Figura 24 – Tipo de lâmina utilizada para raspagem de tecido gengival.	50
Figura 25 – Disco contendo amostra e estojo utilizado para armazenar discos.	51
Figura 26 – Foto do sistema S2 PICOFOX utilizado ao lado do notebook responsável por fazer a análise de dados.	52
Figura 27 – Corte transversal de um detector SDD.	53
Figura 28 – Diagrama de blocos do S2 PICOFOX.	54

Figura 29 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A1.	57
Figura 30 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A1.	58
Figura 31 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A2.	59
Figura 32 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A2.	60
Figura 33 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A3.	62
Figura 34 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A3.	63
Figura 35 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A4.	64
Figura 36 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A4.	65
Figura 37 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B1.	67
Figura 38 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B1.	68
Figura 39 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B2.	69
Figura 40 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B2.	70
Figura 41 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B3.	72
Figura 42 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B3.	73
Figura 43 – Contagens medidas para os elementos detectados na Paciente C1.	75
Figura 44 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado da Paciente C1.	76
Figura 45 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente C2.	77
Figura 46 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado do Paciente C2.	78
Figura 47 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente C2.	79
Figura 48 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado do Paciente C3.	80
Figura 49 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente Controle.	82
Figura 50 – Espectro obtido para uma amostra de sulco de implante saudável coletado do Paciente Controle.	83
Figura 51 – Biplot da PCA para as contagens medidas.	84
Figura 52 – Taxa de variação explicada para cada uma das PC's.	85
Figura 53 – Eixo positivo da PC1 da PCA para os dados de contagens.	86
Figura 54 – Eixo negativo da PC1 da PCA para os dados de contagens.	86
Figura 55 – Contagens de enxofre, cloro, titânio e ferro para as amostras coletadas em sulcos com peri-implantite.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de materiais utilizados na confecção de implantes.	36
Tabela 2 – Características gerais dos pacientes analisados.	47
Tabela 3 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 1.	48
Tabela 4 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 2.	48
Tabela 5 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 3.	48
Tabela 6 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A1. . . .	56
Tabela 7 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A2. . . .	60
Tabela 8 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para a Paciente A3. . . .	61
Tabela 9 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A4. . . .	63
Tabela 10 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B1. . . .	66
Tabela 11 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B2. . . .	70
Tabela 12 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B3. . . .	71
Tabela 13 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C1. . . .	74
Tabela 14 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C2. . . .	76
Tabela 15 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C3. . . .	80
Tabela 16 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente Controle. .	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	Radiação Eletromagnética	16
3.1.1	Raios X	17
3.2	Interação da Radiação Eletromagnética com a Matéria	19
3.2.1	Efeito Fotoelétrico	19
3.2.1.1	Efeito Auger	21
3.2.2	Espalhamento Compton	21
3.2.3	Espalhamento Rayleigh	23
3.3	Fundamentos da Fluorescência de Raios X	24
3.3.1	Excitação dos Elementos	25
3.3.2	Raios X Característicos	26
3.3.3	Detecção e Medida dos Raios X Característicos	28
3.3.4	Equação Fundamental para a Fluorescência de Raios X	29
3.4	Fluorescência de Raios X	30
3.4.1	Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF)	31
3.4.2	Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)	32
3.5	Próteses e Implantes Dentais	35
3.5.1	Implantes de Titânio	36
3.5.2	Peri-Implantite	38
3.5.3	Liberação de Titânio	39
3.6	Análise de Fluidos Biológicos	39
3.6.1	Saliva	40
3.7	Análise Multivariada	40
3.7.1	Pré-Processamento de Dados	41
3.7.2	Análise de Componentes Principais (PCA)	42
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	44
5	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1	Porta-Amostra	46

5.2	Coleta das Amostras	46
5.3	Preparação das Amostras	50
5.4	Sistema S2 PICOFOX	51
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1	Elementos Detectados	55
6.2	Grupo A	55
6.2.1	Paciente A1	56
6.2.2	Paciente A2	58
6.2.3	Paciente A3	60
6.2.4	Paciente A4	63
6.3	Grupo B	66
6.3.1	Paciente B1	66
6.3.2	Paciente B2	68
6.3.3	Paciente B3	70
6.4	Grupo C	73
6.4.1	Paciente C1	73
6.4.2	Paciente C2	76
6.4.3	Paciente C3	78
6.5	Paciente Controle	81
6.6	Análise de Componentes Principais	83
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
A	PROGRAMA	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS Amyotrophic Lateral Sclerosis (Esclerose Lateral Amiotrófica)

BOP Bleeding on Probing

EDXRF Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva)

LLD Lower Limit of Detection (Limite Mínimo de Detecção)

PC Principal Component (Componente Principal)

PCA Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

SVD Singular Value Decomposition (Decomposição de Valores Singulares)

TXRF Total Reflection X-Ray Fluorescence (Fluorescência de Raios X por Reflexão Total)

WDXRF Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence (Fluorescência de Raios X por Dispersão do Comprimento de Onda)

XRF X-Ray Fluorescence (Fluorescência de Raios X)

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso de implantes e próteses dentárias tornou-se comum para recuperação total ou parcial de pacientes edêntulos [1]. Por conta disso, complicações biológicas que afetam implantes osseointegrados se tornaram um tópico de interesse na odontologia moderna [2].

O implante dentário é uma peça metálica (normalmente feita de titânio) com formato semelhante ao de um parafuso que é fixado na mandíbula e faz papel de raiz para a fixação de uma prótese [3]. Assim como dentes saudáveis, próteses e implantes são um ambiente favorável para proliferação de doenças que se espalham pelos tecidos gengival e ósseo caso não haja manutenção correta. Analogamente à periodontite, que ataca as estruturas que sustentam os dentes, usuários de próteses podem ser vítimas da peri-implantite [2]. No cenário clínico, a presença da condição é detectada pelo sangramento das gengivas ao manipular o tecido (*bleeding on probing*, BOP) e por perda de estrutura óssea verificada por meio de radiografias [2].

A peri-implantite é uma condição patológica normalmente causada pela ação de bactérias [2, 4, 5] que ocorre em tecidos ao redor de próteses dentais, caracterizados pela inflamação no tecido peri-implantar e progressiva perda do suporte ósseo [2]. A ação dessas bactérias sobre a prótese metálica acarreta na corrosão do titânio que compõe a peça [5].

Neste trabalho são analisadas amostras de tecido gengival coletadas em várias regiões da boca de pacientes que sofrem com essa doença, com o intuito de caracterizar a composição elementar dessas amostras com a infecção. Baseado nos resultados verificados por Soler e colaboradores [5], também foram feitas coletas de tecido gengival ao redor de implantes acometidos pela doença para verificar como o material corroído dos implantes se comporta.

Fazer a análise de comportamentos de doenças através da composição elementar de amostras coletadas é uma técnica moderna de análise que permite identificar em mais detalhes como ocorre a interação da doenças com o organismo. Com isso, torna-se possível entender ainda mais sobre algumas doenças e como detectá-las em seres vivos. Particularmente, por este trabalho envolver amostras de saliva, é possível fazer esse tipo de detecção por meio de coleta de amostras de forma indolor e não invasiva.

A análise das amostras foi feita utilizando a técnica de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF), uma vez que apresenta boa sensibilidade para elementos de baixa concentração (partes por milhão a partes por bilhão) e permite analisar amostras de dimensões reduzidas [6]. Além disso, a análise quimiométrica será feita utilizando a técnica de análise de componentes principais (PCA) para verificar se existe um comportamento similar para um dado elemento que agrupe o conjunto de amostras entre grupos com e sem peri-implantite.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é o de analisar amostras salivares de pacientes afetados por peri-implantite divididos entre três grupos e determinar como os elementos encontrados se relacionam com a infecção. A análise será feita empregando a técnica de Espectroscopia por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) com auxílio da análise exploratória multivariada para relacionar a composição elementar das amostras coletadas com a incidência da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a faixa de elementos químicos presentes nas amostras de saliva por TXRF;
- Verificar quais elementos podem ser relacionados com a presença da doença;
- Determinar qual região dos implantes perdidos por ação da peri-implantite apresentou maiores sintomas da doença;
- Verificar se o titânio corroído dos implantes é absorvido pela gengiva;
- Utilizar a análise exploratória multivariada por Análise de Componentes Principais (PCA) para verificar a similaridade dos padrões de distribuição dos elementos químicos identificados nas amostras de saliva de diferentes regiões da boca de vários pacientes para relacionar os elementos encontrados com a ocorrência de peri-implantite.

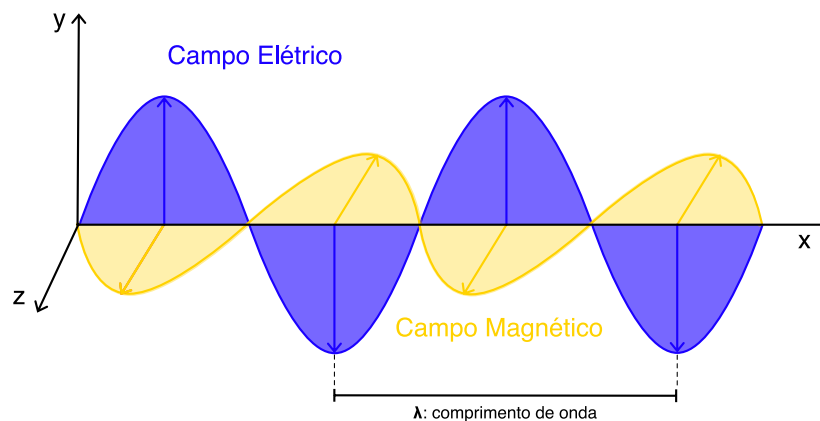
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Radiação Eletromagnética

A radiação eletromagnética, como o nome sugere, surge da interação entre campos elétricos e campos magnéticos. O campo elétrico pode ser entendido como uma entidade física que preenche o espaço em torno de qualquer carga elétrica. Quando a carga geradora do campo entra em movimento, ela começa a exercer um outro tipo de interação com cargas em suas vizinhança que podem ser descritas por meio do campo magnético [7]. Os fenômenos magnéticos são mais facilmente percebidos para um fluxo de cargas elétricas em movimento, que recebe o nome de corrente elétrica.

Ambos os tipos de campos podem ser estacionários ou oscilantes com o tempo, sendo que oscilações do tipo senoidal são uma boa aproximação. Se em determinada região do espaço houver a presença dos dois tipos de campo e estes forem perpendiculares entre si e ambos tiverem caráter oscilatório, ocorre a formação de uma onda eletromagnética. Este fenômeno está ilustrado na Figura 1, vale ressaltar que o sentido de propagação da onda será perpendicular aos dois campos simultaneamente.

Figura 1 – Esquematização de uma onda eletromagnética.

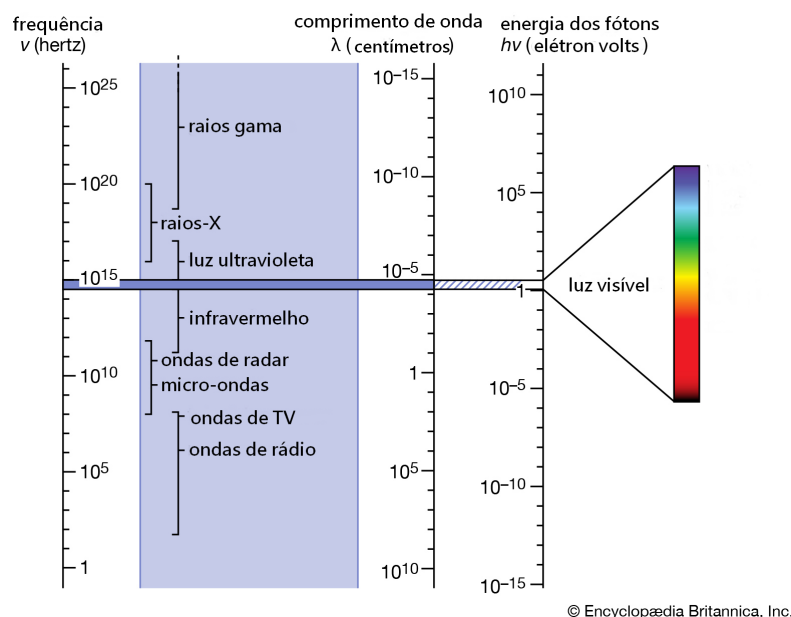


Fonte: elaborado pelo autor.

Assim como ondas mecânicas, as ondas eletromagnéticas são descritas em função de uma frequência de oscilação (ν) e de um comprimento de onda (λ). Com base nesses valores, é possível definir e organizar diferentes tipos de ondas eletromagnéticas. A Figura 2 ilustra o espectro eletromagnético indicando os tipos de ondas eletromagnéticas mais importantes.

Quando uma partícula carregada se encontra acelerada, ela produz um terceiro tipo de campo chamado de campo de radiação [7]. O campo de radiação é formado por ondas eletromagnéticas que carregam mais energia e têm alcance maior do que os campos elétrico e

Figura 2 – Ilustração do espectro eletromagnético.



Fonte: [8], adaptado.

magnético, uma vez que sua intensidade é proporcional a $1/r$ e não $1/r^2$ [9].

Como todo corpo com temperatura superior ao zero absoluto tem cargas aceleradas, pode-se afirmar que todo corpo cuja temperatura é maior do que 0 K emite radiação eletromagnética [10]. Sendo o corpo negro um exemplo clássico para essa situação. Por definição, um corpo negro é um objeto que absorve toda a radiação que recebe, aumentando sua temperatura no processo. Conforme as partículas no interior do corpo negro são aceleradas, este começa a emitir sua própria radiação [11]. Com o que se acreditava até o final do XIX, a emissão de radiação por um corpo deveria ser contínua e proporcional à quarta potência de sua temperatura.

Os estudos realizados por Max Planck (1858-1947) no início do século XX trouxeram uma nova abordagem para a Física de radiações. O alemão propôs que a emissão de radiação não é arbitrária, mas sim distribuída em pequenos pacotes nomeados de *quanta* [12]. Deste ponto em diante, é possível descrever a luz (e todo o espectro eletromagnético) não apenas como ondas, mas também como um conjunto de partículas de energia $h\nu$ chamados de fótons. Fótons com a mesma frequência, portanto, correspondem ao mesmo tipo de emissão e a intensidade irradiada pode ser mensurada à partir da quantidade de fótons detectados.

3.1.1 Raios X

A emissão de raios X foi descoberta em 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) na Universidade de Würzburg, na Bavaria. Ao realizar experimentos utilizando um tubo de raios catódicos (Figura 3a), Röntgen verificou que alguns cristais de platinocianeto de bário posicionados próximos ao tubo fluoresciam quando a descarga elétrica dentro do tubo ocorria mesmo se o tubo estivesse completamente coberto. A sua descoberta e subsequente experimen-

tos envolvendo a nova radiação, renderam à Röntgen o primeiro Prêmio Nobel de Física em 1901 [13].

Röntgen descreveu algumas das propriedades da nova radiação como:

Ela produzia luminescência em certos materiais fluorescentes, sensibilizava chapas fotográficas, mas em si era invisível ao olho humano, não parecia sofrer refração, nem reflexão, nem polarização. Não se tratava de luz (por ser invisível e atravessar grandes espessuras de madeira ou papel), não era igual aos raios catódicos (não sofria desvio com ímãs e tinha poder de penetração muito superior), nem aos raios ultravioleta ou infravermelho (pelo seu poder de penetração). [14, 15].

O cientista se interessou tanto por esse fenômeno que nos anos seguintes continuou fazendo uma série de experimentos envolvendo a nova radiação. Enquanto testava o poder de penetração de sua descoberta ao analisar as sombras de objetos projetadas sobre um detector fluorescente, Röntgen pôde ver também a projeção dos ossos de sua mão na tela [16]. A Figura 3b mostra a impressão tirada da mão esquerda da esposa de Röntgen, tal resultado é o que deu origem à radiografia [14].

As principais propriedades dos raios X aceitas atualmente são [13]:

- São invisíveis ao olho humano;
- Se propagam em linha reta com velocidade igual à da luz;
- Não são afetados por campos elétricos e magnéticos;
- São absorvidos diferentemente pela matéria ao atravessar materiais de distintas densidades, composições ou espessuras;
- Podem ser refletidos, difratados, refratados e polarizados;
- São capazes de ionizar gases;
- Podem afetar propriedades elétricas de sólidos e líquidos;
- Podem escurecer chapas fotográficas;
- Capazes de liberar fotoelétrons e elétrons de recuo;
- Podem produzir reações biológicas (causar dano ou morte a células vivas, mutação, etc.);
- São emitidas em um espectro contínuo cujo comprimento de onda é determinado pela diferença de potencial aplicada no tubo emissor;
- São emitidos em linhas características para cada elemento químico; e
- Possuem um espectro de absorção característico para cada elemento químico.

Figura 3 – Tubo de raios catódicos e radiografia da mão da esposa de Röntgen.

(a) Tubo de raios catódicos utilizado nos experimentos de Röntgen.



(b) Sombra da mão esquerda da esposa de Röntgen.



Fonte: [17]

Na realização desse trabalho foram utilizados fótons na faixa de energia de até 50 keV, as principais interações com a matéria que esses tipos de fótons produzem são: espalhamento coerente (efeito Rayleigh), espalhamento incoerente (efeito Compton) e efeito fotoelétrico [18].

3.2 Interação da Radiação Eletromagnética com a Matéria

3.2.1 Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico consiste na absorção de fótons por um elétron atômico seguido pela ejeção deste elétron do átomo [19]. A radiação incidente pode ser infravermelha, visível, ultravioleta, raios X ou raios gama; o material-alvo pode ser sólido, líquido ou gasoso. As partículas emitidas pelo alvo podem ser íons ou elétrons.

A descoberta do efeito fotoelétrico aconteceu em 1887 pelos estudos do físico alemão Heinrich Rudolf Hertz. O cientista verificou que quando a luz ultravioleta atinge dois eletrodos metálicos que têm uma diferença de potencial aplicada sobre eles, a luz altera essa voltagem. O efeito foi explicado com mais clareza em 1902 por outro físico alemão, Philipp Lenard, que demonstrou que a alteração verificada se dá pela emissão de partículas da superfície metálica idênticas aos elétrons.

Quando um elétron é ejetado da superfície metálica, sua energia cinética é definida como a energia do fóton incidente subtraída pelo trabalho necessário para colocar o elétron em movimento (sendo este valor igual à energia de ligação do elétron). Sendo a energia do fóton definida por $E_{\text{inc}} = h\nu$ e a energia de ligação dos elétrons por E_K , onde o subíndice indica a

camada da qual o elétron foi ejetado, a energia cinética do fotoelétron ejetado será:

$$K = h\nu - E_K . \quad (3.1)$$

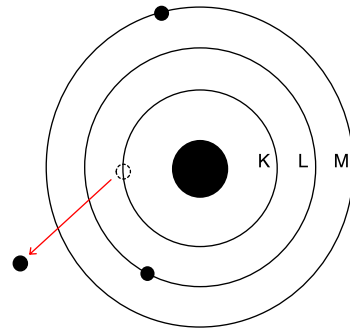
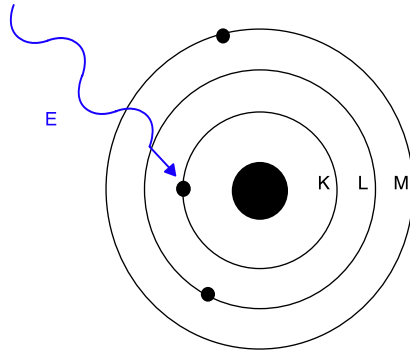
Onde fica claro que para ocorrer a emissão é necessário que $E_{inc} > E_K$.

O efeito fotoelétrico ocorre principalmente em situações de baixas energias para elementos com número atômico Z elevado e é proporcional a Z^4 [6]. Para diferentes elétrons ligados a um mesmo átomo, a probabilidade de que o efeito ocorra é proporcional à energia de ligação dos elétrons. Isto é, quão mais fortemente ligado o elétron estiver, maior é a probabilidade de que o efeito ocorra [20]. A emissão de raios X por efeito fotoelétrico se dá em três etapas que estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4 – Emissão de raios X por meio de efeito fotoelétrico.

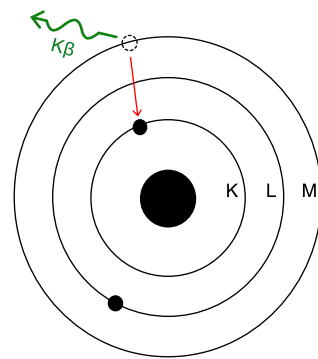
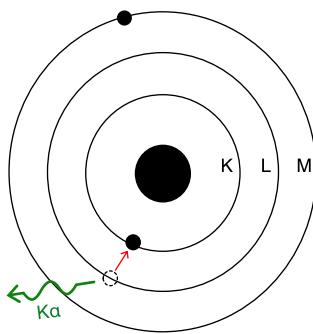
(a) Absorção de radiação por elétron da camada K.

(b) Ejeção do elétron e produção de vacância.



(c) Ocupação da vacância por elétron da camada L e emissão de raios X de linha $K\alpha$.

(d) Ocupação da vacância por elétron da camada M e emissão de raios X de linha $K\beta$.



Fonte: elaborado pelo autor.

A descrição para cada uma das etapas é:

1. Um elétron atômico de camada interna é atingido pela radiação incidente de energia E_{inc} (Figura 4a);
2. Esse elétron absorve a radiação e é ejetado (Figura 4b);

3. A vacância deixada pelo elétron ejetado é preenchida por algum elétron de camada superior e a diferença de energia entre o nível do elétron substituto e a vacância é liberada na forma de raio X característico (Figura 4c ou 4d).

Nas Figuras 4c e 4d ocorrem dois tipos diferentes de emissão de raios X. Evidentemente a diferença se dá pelas diferentes origens dos elétrons que ocupam a vacância [21]. Há uma regra de nomenclatura para determinar as emissões: a letra maiúscula indica a camada de onde um elétron foi ejetado e a letra grega indica por quantas camadas o elétron que preencheu a vacância foi deslocado, sendo $\alpha \rightarrow 1$, $\beta \rightarrow 2$ e assim por diante.

3.2.1.1 Efeito Auger

Quando um átomo recebe energia externa e entra em um estado excitado, é possível que essa excitação seja transferida a um elétron atômico ao invés de gerar raios X característicos. A emissão do elétron que recebe esse saldo energético constitui o efeito Auger [19]. De modo geral, a probabilidade de que o efeito Auger ocorra é inversamente proporcional à diferença entre as energias de ligação dos estados correspondentes, e é mais comum em elementos com número atômico baixo.

É possível que a emissão de elétrons Auger ocorra em grupos, mas suas energias se assemelham à de processos atômicos, visto que não passam de alguns keV. Por conta disso, eles se tornam suscetíveis à auto-absorção e são difíceis de serem detectados.

Como um átomo excitado já apresenta um déficit eletrônico, a emissão de um elétron Auger deixa o átomo em um estado de dupla ionização. Esse átomo pode retornar a seu estado fundamental por meio da emissão de dois fótons de raios X, por exemplo. Mas ainda é possível que ocorra uma segunda emissão de elétron Auger, deixando o átomo triplamente ionizado e tornando necessária a emissão de três fótons para voltar ao estado fundamental [19].

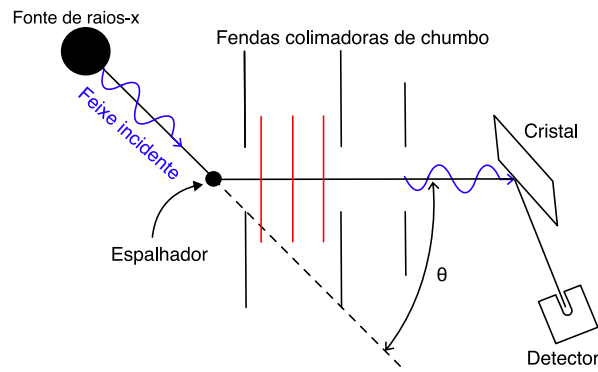
3.2.2 Espalhamento Compton

Esse tipo de interação ocorre entre um fóton e um elétron livre, mas pode ocorrer com um elétron atômico desde que a energia de ligação do elétron seja desprezível se comparada à energia do fóton incidente [19].

Há aproximadamente um século, a natureza corpuscular da radiação ficou ainda mais evidente mediante os resultados dos experimentos realizados pelo físico estadunidense Arthur H. Compton [11]. Em seus experimentos, o físico incidiu um feixe de raios X com comprimento de onda λ sobre um alvo de grafite, como ilustra a Figura 5. Compton verificou que apesar de apenas um feixe com comprimento de onda λ ser incidido sobre o espalhador, os feixes espalhados apresentam *dois* picos de intensidade. Um deles com o mesmo comprimento de onda λ e outro com $\lambda' = \lambda + \Delta\lambda$. O *desvio Compton*, $\Delta\lambda$, como ficou conhecido varia de

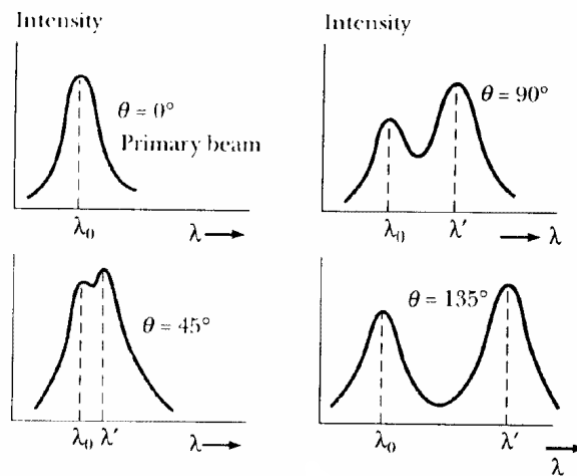
acordo com o ângulo com o qual os feixes de raios X são espalhados. A Figura 6 ilustra o espectro verificado pelo experimento de Compton para diversos ângulos de espalhamento.

Figura 5 – Experimento realizado por Compton para verificar o espalhamento Compton. Raios X monocromáticos de comprimento de onda λ atingem o espalhador e são espalhados de acordo com um ângulo θ .



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6 – Espectros observados para o experimento de Compton para diversos ângulos de espalhamento.

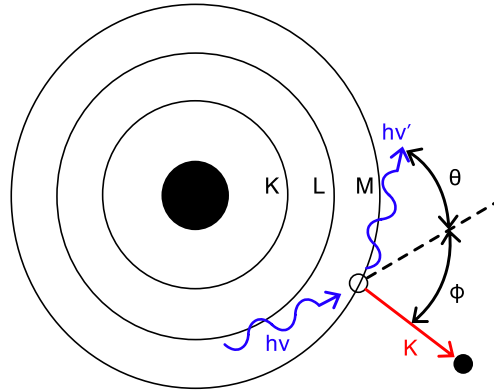


Fonte: [22], adaptado.

Em escala atômica, o que se verifica é que um elétron com baixa energia de ligação é atingido por um fóton que tem apenas parte de sua energia absorvida. Como consequência dessa interação, o fóton é espalhado com energia reduzida formando um ângulo θ em relação à sua trajetória original e o elétron é ejetado da eletrosfera formando um ângulo ϕ em relação à trajetória do fóton incidente [11,20].

Esse fenômeno está retratado na Figura 7, onde o fóton incide com energia $h\nu$ sobre o elétron na camada mais externa, que absorve parte dessa energia. O fóton então é espalhado com uma nova energia $h\nu'$, sofrendo um desvio θ de sua trajetória inicial. O elétron, por sua

Figura 7 – Esquemática do efeito Compton.



Fonte: elaborado pelo autor.

vez, absorve uma fração da energia incidente e é ejetado da eletrosfera sofrendo um desvio ϕ em relação à trajetória inicial do fóton.

Aplicando as equações de conservação de energia e momento para as partículas envolvidas, é possível encontrar as seguintes relações para os valores de energia e ângulos de espalhamento [19]:

$$\begin{aligned}
 h\nu' &= \frac{h\nu}{1 + \gamma(1 - \cos \theta)}, \\
 K &= h\nu - h\nu' = h\nu \frac{\gamma(1 - \cos \theta)}{1 + \gamma(1 - \cos \theta)}, \\
 \cos \theta &= 1 - \frac{2}{(1 + \gamma)^2 \tan^2 \phi + 1}, \\
 \cot \phi &= (1 + \gamma) \tan \frac{\theta}{2},
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

onde $\gamma = h\nu/m_e c^2$.

Quando o elétron escapa do átomo, este fica em um estado excitado com energia igual à energia de ligação do elétron ejetado. O átomo retornará a seu estado fundamental através da emissão de fótons fluorescentes (raios X) e elétrons Auger [23].

3.2.3 Espalhamento Rayleigh

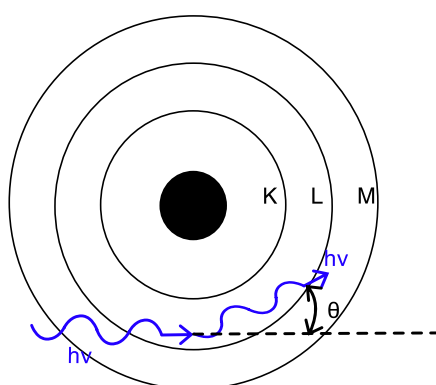
Outro efeito que um fóton pode sofrer ao interagir com a matéria é o espalhamento Rayleigh, também conhecido como espalhamento elástico ou coerente. Esse tipo de interação se diferencia do espalhamento Compton por dois motivos principais:

1. o fóton interage com o átomo como um todo, não apenas com um elétron;
2. o fóton é desviado sem perder energia.

Como não há troca de energia, nesse processo não ocorre excitação e nem ionização do átomo [19].

O espalhamento Rayleigh ocorre principalmente em situações de baixas energias e em materiais com Z alto, na mesma região em que os efeitos de ligação dos elétrons influenciam na probabilidade de ocorrência do espalhamento Compton [13]. Uma esquematização do espalhamento Rayleigh está ilustrada na Figura 8. A direção dos fótons que sofrem esse efeito é predominantemente a de baixos ângulos de espalhamento.

Figura 8 – Esquematização do espalhamento Rayleigh.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3 Fundamentos da Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X (XRF, do inglês *X-Ray Fluorescence*) é uma técnica analítica multi-elementar e não destrutiva que pode ser utilizada para determinar a composição elementar de amostras sólidas, líquidas, pastosas e em pó [24, 25]. A técnica pode ser utilizada para analisar elementos desde o berílio até o urânio com precisão de partes por bilhão (ppb) [13], a depender do equipamento, da variante da técnica utilizada e da forma em que amostra se encontra (sólido, líquido, filme fino, etc.). A técnica se baseia na produção de raios X característicos dos elementos de uma amostra ao ser irradiada.

A técnica de XRF divide-se em duas variantes analíticas distintas: a baseada na dispersão por comprimento de onda (WDXRF), e a dispersão por energia (EDXRF) [13, 25]. A primeira surgiu na década de 60, enquanto a segunda foi desenvolvida aproximadamente uma década depois com o advento dos detectores semicondutores [25].

A característica principal da WDXRF é o emprego de um cristal monocromador posicionado entre a amostra e o detector. Este cristal seleciona os diferentes comprimentos de onda que o atravessam de modo que apenas um comprimento atinja o detector por vez, sendo necessário realizar repetidas medições para determinar a composição elementar de uma amostra [13].

Em contrapartida, a EDXRF faz uso de detectores semicondutores que produzem em seu interior sinais elétricos dependentes da energia incidente (Figura 27). Portanto, esta propriedade dispensa o uso do cristal monocromador.

É possível, ainda, dividir a EDXRF em duas sub-variantes: a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), e a micro-fluorescência de raios X (μ -XRF). As maiores vantagens da TXRF em relação à EDXRF tradicional são as pequenas quantidades de amostras necessárias (da ordem de 5 μ l a 10 μ l) e menores valores para os limites de detecção [25].

A fluorescência de raios X corresponde à emissão de raios X característicos pelos elementos químicos de uma amostra ao serem excitados pela emissão de radiação de uma fonte. A fluorescência emitida é então captada por um detector e classificada de acordo com a energia das emissões, visto que cada elemento possui um espectro particular de raios X.

3.3.1 Excitação dos Elementos

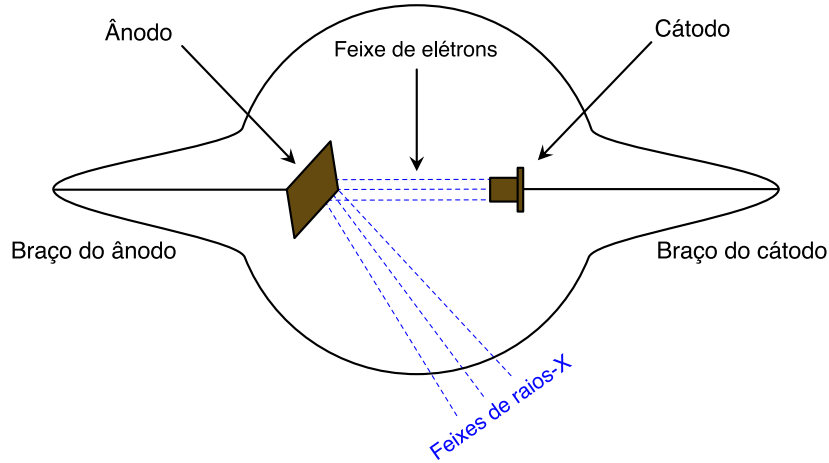
Para que haja emissão da fluorescência é necessário que os átomos que compõe a amostra sejam excitados de alguma forma. Os agentes dessa excitação podem ser partículas (elétrons, prótons, íons, alfa ou beta) ou radiações (raios X ou gama de baixa energia) [25, 26]. Quando a amostra é excitada, os elétrons das camadas mais internas dos átomos recebem a energia incidente e, se essa energia for maior do que a energia de ligação dos elétrons, eles são ejetados da eletrosfera.

Normalmente, a fonte de excitação utilizada para causar a fluorescência são tubos de raios X. Dentro desse aparato, elétrons são emitidos de um cátodo e acelerados em direção a um ânodo por intermédio de um campo elétrico gerado pela diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo [27]. A geometria básica de um tubo de raios X está ilustrada na Figura 9. Quando esses elétrons acelerados atingem o ânodo, eles interagem com os átomos que compõe o alvo e perdem sua energia por uma série de processos. Vale ressaltar que o material do ânodo é o que define cada tipo de tubos de raios X, sendo os tubos de tungstênio e molibdênio os mais utilizados.

A primeira interação que pode ocorrer é a colisão, elástica ou inelástica, dos elétrons emitidos com o alvo. Sendo a probabilidade de que a colisão elástica ocorra maior do que a da inelástica. Apenas uma pequena parte dos elétrons incidentes sofrem espalhamento inelástico, desacelerando continuamente na presença de um campo de Coulomb intenso. Esse procedimento é o que dá origem ao *espectro contínuo* de emissão, também conhecido como *Bremsstrahlung* (do alemão, "radiação de freamento") [27].

Além disso, os elétrons incidentes transferem suas energias ao atingirem o alvo. O processo dominante consiste de subseqüentes colisões com os átomos mais externos do ânodo, transferindo pequenas quantidades de energias em cada uma das colisões. Entretanto, ainda é possível que um elétron atômico mais interno seja alvo do elétron incidente e, ao receber a

Figura 9 – Geometria básica de um tubo de raios X.



Fonte: elaborado pelo autor.

energia, o efeito fotoelétrico ocorre. Esse procedimento dá origem às *linhas características de emissão* do espectro de emissão dos raios X [27].

A energia de ligação dos elétrons presos a um núcleo pode ser calculada, aproximadamente, utilizando a equação

$$E = \frac{m_e e^4 (Z - b)^2}{8 \varepsilon_0 h^2 n^2}, \quad (3.3)$$

onde E representa a energia de ligação eletrônica (J); m_e é a massa de repouso do elétron (9.11×10^{-31} kg); e é a carga elétrica do elétron (1.69×10^{-19} C); Z é o número atômico do elemento em análise; b é a constante de Moseley, e tem valores iguais a 1 e 7.4 para as camadas K e L, respectivamente; ε_0 é a permissividade elétrica do vácuo (8.85×10^{-12} C.N⁻¹.m⁻²); h é a constante de Planck (6.62×10^{-34} J.s) e n é o número quântico principal do nível eletrônico [28].

Substituindo todas as constantes por seus valores numéricos no Sistema Internacional de Medidas, a Equação (3.3) é simplificada para

$$E = 13.6 \frac{(Z - b)^2}{n^2}. \quad (3.4)$$

Com isso, fica evidente que a energia de ligação de um elétron para alguma camada pode ser aproximada para uma função do número atômico Z [28].

3.3.2 Raios X Característicos

Uma vez que o elétron é ejetado das camadas mais internas do átomo, a camada passa a apresentar uma vacância que deixa o átomo instável. A vacância resultante deve ser preenchida por outro elétron, proveniente de alguma camada mais externa.

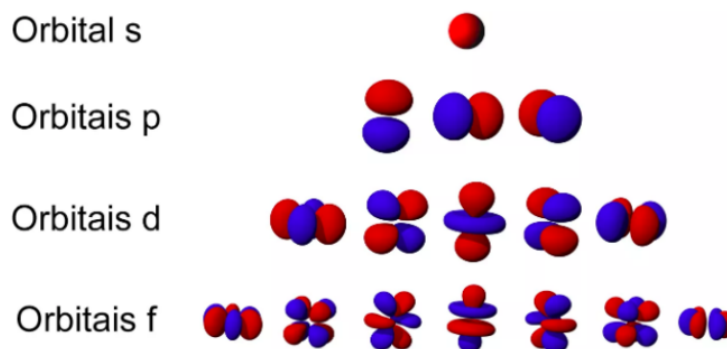
Assim como as vacâncias podem surgir em várias camadas, ainda é possível que o elétron que emite raios X para preenchê-las parta de várias camadas diferentes. Isso resulta em emissões distintas que podem ser diferenciadas uma da outra através do seu valor energético. Entretanto existem transições possíveis e transições proibidas entre os sub-níveis de uma eletrosfera [13], sendo estas determinadas de acordo com a variação dos números quânticos dos elétrons. O conjunto das distintas emissões possíveis dão origem às linhas espectrais de um elétron.

As transições que cada elétron pode executar entre as camadas eletrônicas de um átomo estão sujeitas às regras de seleção da mecânica quântica. Cada elétron ligado é descrito por meio de uma série de números quânticos, sendo os quatro mais comuns: n , l , s e j [29]

O número quântico principal, n , descreve a energia de um elétron ligado. Como a energia de um elétron atômico é igual à sua energia de ligação para a camada em que se encontra, o número quântico n está associado com as camadas eletrônicas de um átomo. Desse modo, $n = 1, 2, 3$ equivalem aos níveis K, L e M, respectivamente e assim por diante.

O número quântico azimutal, l , determina a forma de um orbital e está associado com o subníveis de cada camada. Assim como para n , a contagem é feita para números inteiros indo de 0 a $n - 1$. Dessa forma, $l = 0, 1, 2$ equivale aos subníveis s , p e d , respectivamente e assim por diante. A Figura 10 ilustra as possíveis formas de orbitais atômicos.

Figura 10 – Possíveis orbitais atômicos em função do valor do número quântico azimutal.



Fonte: [30]

O número quântico de spin, s , representa o momento angular intrínseco de um elétron e não depende de qualquer outro número quântico. s pode assumir os valores $-1/2$ ou $1/2$, indicando spin *down* e *up* respectivamente. Por fim, o número quântico de momento angular total, j , é definido pela soma dos dois momentos angulares do elétron: $j = s + l$. Este número quântico pode assumir valores semi-inteiros positivos.

As regras de seleção de transição eletrônica dependem direta ou indiretamente de todos os números quânticos citados. Alguns exemplos de transições permitidas estão ilustrados na Figura 11, e algumas regras de seleção para os números quântico azimutal, l , e o de momento

angular total, j , são:

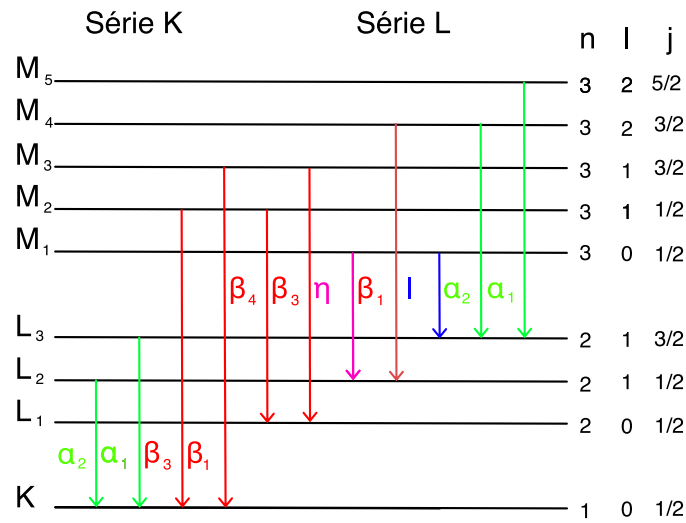
$$\Delta l = \pm 1, \quad \Delta j = 0 \text{ ou } \pm 1, \quad (3.5)$$

onde a transição $j : 0 \rightarrow 0$ é proibida, ou

$$\Delta l = 0 \text{ ou } \pm 2, \quad \Delta j = 0, \pm 1 \text{ ou } \pm 2, \quad (3.6)$$

sendo as transições $j : 0 \rightarrow 0, 1/2 \rightarrow 1/2, 0 \leftrightarrow 1$ também proibidas [13,31].

Figura 11 – Esquema de transições permitidas entre sub-níveis eletrônicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Como os elétrons de camadas superiores são mais energéticos do que os de camada exteriores, suas energias de ligação também serão maiores. Para que um elétron possa preencher a vacância criada, é necessário que ocorra a liberação de um fóton com energia igual à diferença de energia de ligação entre sua camada de origem e a camada de destino. Isto é, a energia do fóton emitido é obtida pela equação

$$E_x = E_{n,i} - E_{n,f}. \quad (3.7)$$

Onde $E_{n,i}$ e $E_{n,f}$ representam as energias de ligação das camadas inicial e final do elétron, respectivamente [28]. Esse processo se repete quantas vezes for necessário, até que a vacância esteja na camada de valência do átomo.

3.3.3 Detecção e Medida dos Raios X Característicos

Nas técnicas de EDXRF e TXRF, a radiação fluorescida é emitida em direção a um detector que é responsável por converter a radiação incidente em pulsos elétricos proporcionais às energias dos raios X característicos. Os principais tipo de detectores de radiação utilizados são:

Ionização: detectores de ionização são câmaras de gases que, ao receberem radiação, sofrem ionização. Os íons liberados geram pulsos elétricos em um cátodo e a partir da diferença de potencial gerada, determina-se a intensidade da radiação fluorescida;

Cintiladores: detectores de cintilação são compostos por um material que emite *flashes* luminosos ao receber radiação. Os *flashes* então passam por um fotomultiplicador e um fotocátodo, onde são convertidos em pulsos elétricos, e a partir da diferença de potencial gerada, determina-se a intensidade da radiação incidente; e

Semicondutores: detectores semicondutores são formados por cristais semicondutores (normalmente germânio e silício) ligados a cátodos e ânodos. A radiação que incide no detector faz com que elétrons sejam liberados da estrutura cristalina dando origem a um par elétron/buraco. Os elétrons são levados ao ânodo e a intensidade da radiação incidente é determinada de acordo com a energia dos elétrons coletados.

O funcionamento de detectores semicondutores será explicado com mais detalhes no Capítulo 5, uma vez que o detector utilizado para a realização deste trabalho é dessa natureza.

Os sinais, por sua vez, passam por amplificadores e um analisador de pulso multicanal, que registra e classifica os pulsos em função das suas intensidades de energia. Dessa forma um espectro de emissão composto por vários picos é gerado, onde a área abaixo da curva em cada pico é proporcional à intensidade dos raios X característicos detectados para aquela frequência. Tal intensidade é também proporcional à concentração do elemento com essa emissão característica na amostra analisada.

3.3.4 Equação Fundamental para a Fluorescência de Raios X

A técnica da Fluorescência de Raios X possui uma grande capacidade de correlacionar as intensidades dos raios X característicos recebidos no detector com a composição elementar da amostra analisada. Em pesquisas realizadas utilizando a técnica de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) e suas variantes é necessário compreender como a quantificação dos elementos é feita [28].

Considerando as probabilidades de que qualquer um dos efeitos de interação listados na Seção 3.2 ocorra, é possível chegar à equação fundamental da fluorescência:

$$I_i = C_i \cdot S_i \cdot A_i, \quad (3.8)$$

onde I_i é a intensidade dos raios X medida (cps), C_i é concentração relativa do i -ésimo elemento químico que compõe a amostra ($g_{\text{elemento}}/g_{\text{amostra}}$), S_i é a sensibilidade analítica para o elemento analisado ($\text{cps} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$) e A_i é o fator de absorção da matriz (adimensional) referente ao elemento de interesse [28].

A sensibilidade S é determinada pela equação

$$S = \tau \omega_K f \left(1 - \frac{1}{j} \right) G \epsilon, \quad (3.9)$$

onde τ representa o coeficiente de absorção do elemento para o efeito fotoelétrico (Equação (3.12)), ω_K o rendimento da fluorescência para raios X da camada K (Equação (3.13)), f a fração de fótons emitidos como raios X $K\alpha$, $1 - 1/j$ corresponde à razão de corte de absorção K, G é um fator geométrico da amostra e ϵ corresponde à eficiência do detector para os raios X característicos emitidos pelos componentes da amostra analisada [25].

Ainda, o fator de absorção \mathcal{A} é determinado pela equação

$$\mathcal{A} = \frac{1 - e^{\chi \rho_0 D}}{\chi \rho_0 D}, \quad (3.10)$$

onde ρ_0 é a densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) e D a espessura (cm) e χ o coeficiente de absorção total da matriz ($\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Sendo este último dado por

$$\chi = \frac{\xi_0}{\sin \theta_0} + \frac{\xi}{\sin \theta}. \quad (3.11)$$

Os valores de ξ_0 e ξ referem-se aos coeficientes de absorção da matriz ($\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) para as energias de radiação incidente e dos raios X característicos, respectivamente, e θ_0 e θ são os ângulos das radiações incidentes e emitidas pela amostra analisada, respectivamente, em relação à superfície desta [25].

A Equação (3.10) pode ser simplificada para dois limites. Para amostras conhecidas como *filmes finos*, temos que $D \rightarrow 0$, de modo que $\mathcal{A} \rightarrow 1$. Em contrapartida, para amostras suficientes grossas (aquelas cuja espessura é muito maior do que comprimento necessário para que a radiação incidente seja completamente absorvida) podemos tomar o limite em que $D \rightarrow \infty$, como consequência, a Equação (3.10) pode ser reescrita simplesmente como $\mathcal{A} = (\chi \rho_0 D)^{-1}$.

3.4 Fluorescência de Raios X

A produção da fluorescência está embasada no princípios da mecânica quântica. A emissão das linhas espectrais de raios X característicos de um elemento químico qualquer depende de uma série de eventos probabilísticos: a probabilidade de que fótons incidentes ionizem o átomo-alvo; a probabilidade de que a vacância seja preenchida por um elétron de camada superior; e a probabilidade de que o átomo emita um fóton de raios X e não um elétron Auger [26, 32].

A probabilidade de que um fóton interaja com a matéria é dada pela soma das probabilidades de que cada tipo de interação possa ocorrer [19]. Essas probabilidades são dadas por meio de *coeficientes de absorção de massa* e são uma função da energia do fóton incidente. A equação para calcular o coeficiente de absorção de massa total é, portanto:

$$\mu(E) = \tau(E) + \sigma_{\text{Com}}(E) + \sigma_{\text{ela}}(E) + \kappa(E). \quad (3.12)$$

Onde $\tau(E)$, $\sigma_{\text{Com}}(E)$, $\sigma_{\text{ela}}(E)$ e $\kappa(E)$ correspondem aos coeficientes de absorção de massa para o efeito fotoelétrico, para o espalhamento Compton, para o espalhamento elástico e para a produção de pares¹, respectivamente [19]. No Sistema Internacional de Medidas, os coeficientes são medidos em cm^2g^{-1} .

A energia necessária para que ocorra a produção de pares é de 1.022 MeV. Como a faixa de energias utilizada para a realização desse trabalho foi de 0 a 50 keV, não ocorre produção de pares e podemos assumir $\kappa(E) = 0$. Com isso, os únicos efeitos que vamos considerar são o efeito Compton, o espalhamento elástico e o efeito fotoelétrico - sendo este dominante na Equação (3.12) pois é o efeito predominante para energias abaixo de 100 keV [19].

A probabilidade de que a vacância seja preenchida por um elétron de camada superior está relacionada com as regras de seleção para mudança de nível abordadas na Subseção 3.3.2.

A probabilidade de que o átomo emita um fóton de raios X e não um elétron Auger é o que chamamos de *rendimento de fluorescência*. O rendimento de fluorescência para a camada K de um átomo é

$$\omega_K = \frac{N_f}{N_v}, \quad (3.13)$$

onde N_f corresponde ao número de fótons de fluorescência emitidos pela camada K e N_v o número de vacâncias produzidas nessa camada [19]. Desde que não haja transições entre sub-níveis de uma mesma camada, o mesmo raciocínio pode ser empregado para determinar os rendimentos de fluorescência para camadas superiores. Vale ressaltar que quanto mais baixo o nível, maior é a probabilidade de que ocorra fluorescência.

Nas próximas subseções serão analisadas as principais técnicas empregadas na espectroscopia por fluorescência de raios X.

3.4.1 Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF)

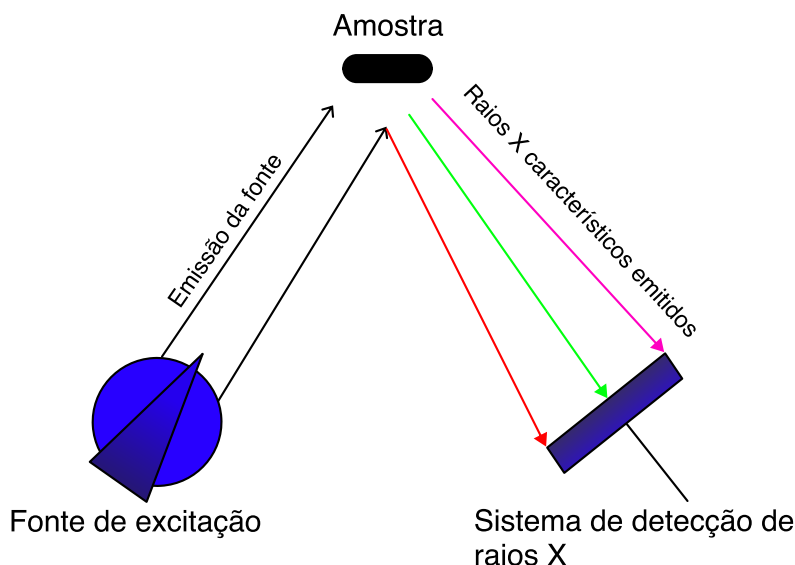
A análise por EDXRF é um método de quantificação baseado na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos por uma fonte que são recebidos em um detector. A técnica pode ser aplicada em diversas áreas científicas pois permite uma análise multi-elementar instantânea de diversos tipos de amostra. A análise ocorre basicamente em três etapas [28, 33]:

1. excitação dos elementos que constituem a amostra por meio da emissão de uma fonte;
2. dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostras; e
3. detecção dos raios X característicos emitidos pela amostras para gerar um espectro de intensidades.

¹ A produção de pares consiste na transformação de um fóton em um par elétron-pósitron na presença de um campo coulombiano [19].

Esse processo está ilustrado na Figura 12. As principais fontes utilizadas para esse tipo de técnica são tubos de raios X; fontes radioativas emissoras de raios X ou radiação gama de baixa energia; e aceleradores de partículas (luz síncrotron).

Figura 12 – Etapas básicas da análise por XRF.



Fonte: elaborado pelo autor.

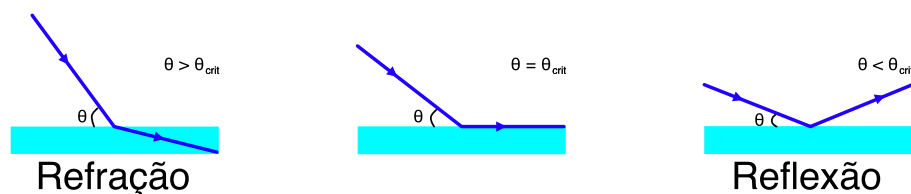
3.4.2 Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)

Outra técnica utilizada para análises por fluorescência de raios X, e o foco deste trabalho, é a TXRF. Nesse caso não temos uma mudança no princípio de funcionamento, como é o caso entre a EDXRF e a WDXRF, mas sim um rearranjo na geometria de um espectrômetro de EDXRF para fazer uso de propriedades reflexivas da radiação e com isso obter uma sensibilidade maior ao analisar alguns tipos de amostra.

A TXRF é baseada nos fundamentos dos fenômenos básicos de reflexão total de um feixe de luz, estendidos para outros tipo de radiação eletromagnética, um feixe de raios X monoenergético. De modo geral, quando este feixe de radiação viaja por um meio até atingir uma superfície plana de determinado material podem ocorrer dois tipos de interação: a refração, onde o feixe penetra o material e sofre um desvio da sua trajetória inicial; ou a reflexão, onde o feixe não penetra na superfície e é refletido pela superfície com um ângulo igual ao de incidência.

Os fenômenos de refração e reflexão dependem do ângulo de incidência do feixe para serem observados. Existe um ângulo crítico, θ_{crit} , tal que se o feixe for incidido sobre uma superfície fazendo este ângulo com a horizontal, o feixe será redirecionado perpendicularmente à superfície. Para ângulos de incidência maiores que este ângulo crítico observamos o fenômenos da refração e, para ângulos menores, temos a reflexão do feixe incidente. Tais comportamentos estão ilustrados na Figura 13.

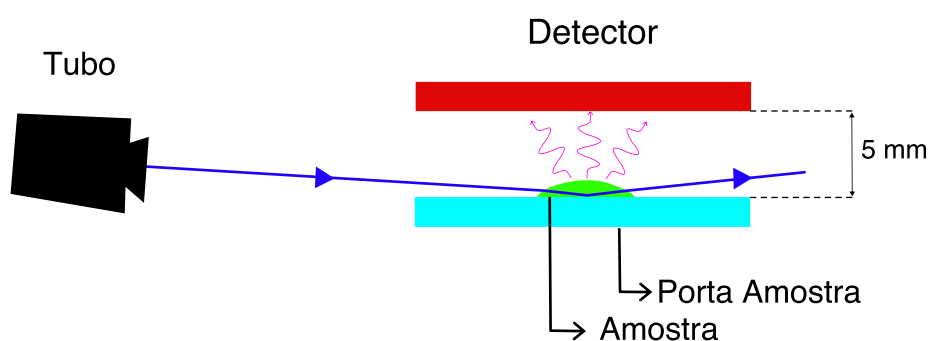
Figura 13 – Possíveis comportamentos observados para um feixe monoenergético incidente sobre uma superfície em função do ângulo crítico.



Fonte: elaborado pelo autor.

Ao ser emitida pela fonte, a radiação atinge a amostra fazendo um ângulo com a horizontal infinitesimalmente menor do que o ângulo necessário para que ocorra a reflexão total (alguns segundos de grau). Com isso, a radiação penetra na amostra depositada sobre o porta-amostra mas é refletida por este, de modo que apenas os raios X característicos serão detectados pelo sistema. A radiação que atinge a amostra é portanto fluorescida em direção ao detector que é posicionado diretamente acima da amostra a uma distância de aproximadamente 5 mm [6]. A Figura 14 mostra a geometria básica de um espectrômetro de TXRF.

Figura 14 – Esquema geométrico básico de um espectrômetro de TXRF.



Fonte: elaborado pelo autor.

O uso dessa geometria especializada tem suas vantagens em relação à EDXRF tradicional. Primeiramente, o rendimento da fluorescência (como descrito pela Equação (3.13)) será maior. Além disso, o *background* medido pela TXRF será menor. Como consequência, as análises por TXRF têm uma sensibilidade extremamente alta para detecção de elementos-traço, encontrando-os na faixa de concentração de até partes por bilhão [6, 34]. Outra vantagem é que o tamanho das amostras analisadas por TXRF tendem a ser menores do que os analisados nas técnicas de WDXRF e EDXRF, podendo ter massa e volume na faixa dos microgramas e microlitros. Dessa forma, o efeito de matriz não é verificado para análises com essa técnica.

A principal área de utilização desta técnica é a de análise águas naturais, buscando detectar a presença de contaminantes e metais pesados. A sensibilidade avantajada em relação às técnicas fundamentais de XRF permite que a presença de contaminantes seja detectada com mais facilidade, sendo possível detectar níveis de concentração da ordem de alguns $\mu\text{g/L}$ [6].

A fundamentação teórica da TXRF pode ser deduzida de uma forma análoga à aplicada na ótica geométrica [13]. Basta considerar a interação entre uma onda eletromagnética que atinge a superfície entre o vácuo e um segundo meio de índice de refração η . Sendo este descrito como a função complexa

$$\eta = 1 - \delta - i\beta, \quad (3.14)$$

onde δ representa a dispersão do feixe como função da densidade do material, e β representa a atenuação sofrida pelo feixe na matéria e depende do coeficiente de absorção da matéria [26]. Esses parâmetros são calculados por

$$\delta = \frac{ne^2\lambda^2}{2\pi m_e c^2} \quad \text{e} \quad \beta = \frac{\mu\lambda}{4\pi}, \quad (3.15)$$

onde n representa a densidade eletrônica, e a energia do elétron e m_e a sua massa, c é a velocidade da luz, μ o coeficiente de absorção de massa e λ representa o comprimento de onda do feixe incidente [13, 26]. A densidade eletrônica, por sua vez, pode ser calculada como

$$n = \frac{N_A \rho Z}{A}, \quad (3.16)$$

sendo $N_A = 6.023 \times 10^{23}$ átomos $\cdot\text{g}^{-1}$ o número de Avogrado, ρ a densidade do material ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), Z o número atômico e A a massa atômica do material ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

O valor do ângulo crítico para cada material pode ser calculado utilizando a Lei de Snell,

$$\cos \theta_{\text{crit}} = \eta. \quad (3.17)$$

Entretanto, δ e β apresentam valores pequenos, sendo β de ordem inferior a 10^{-6} [26]. Por conta disso, esta expressão pode ser simplificada para

$$\cos \theta_{\text{crit}} = 1 - \delta. \quad (3.18)$$

Considerando que θ_{crit} é também um valor pequeno, podemos aplicar a aproximação para pequenos ângulos² de modo a obter

$$1 - \frac{\theta_{\text{crit}}^2}{2} = 1 - \delta \rightarrow \theta_{\text{crit}} = \sqrt{2\delta}. \quad (3.19)$$

Substituindo as definições de δ e n nesta equação, teremos a equação necessária para se calcular o ângulo crítico [13]

$$\theta_{\text{crit}} = \frac{28.8}{E} \sqrt{\frac{Z\rho}{A}}, \quad (3.20)$$

onde fica evidente que o ângulo crítico é inversamente proporcional à energia da radiação incidente.

² $\cos \theta \approx 1 - \frac{\theta^2}{2}.$

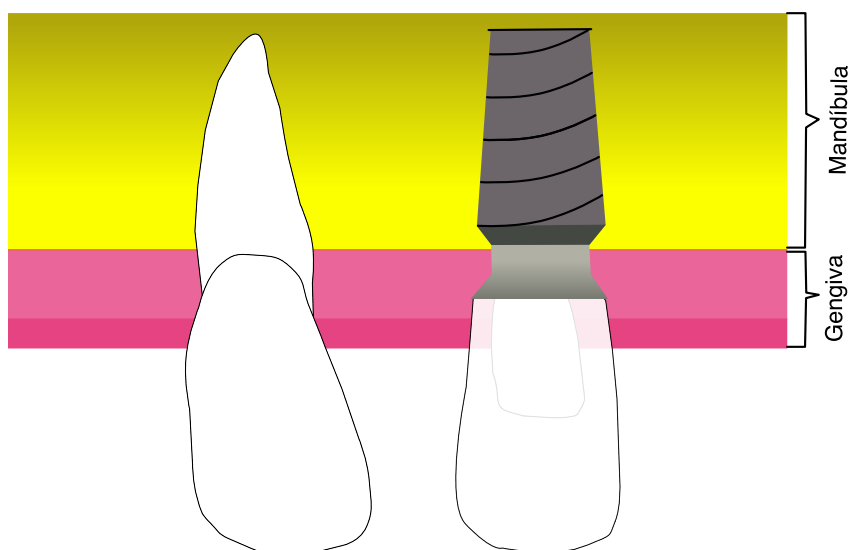
3.5 Próteses e Implantes Dentais

A saúde dental é vulnerável por várias razões e efeito cumulativos são prejudiciais à estrutura podendo levar à perda do dente. Assim que um dente, ou a dentição de modo geral, sofre algum defeito estrutural toda a saúde bucal fica ameaçada pois este tipo de defeito não é auto-regenerativo [35].

Por conta disso, uma forma de contornar essas condições indesejáveis é com o uso de próteses e implantes dentários para substituir um ou mais dentes defeituosos. Além de restaurar a função oral e a estética da boca, próteses dentais devem manter ou melhorar a saúde geral do paciente. Assim sendo, é necessário que os materiais empregados tenham uma boa biocompatibilidade, isto é, tais materiais não devem ter efeitos tóxicos ou danosos para o organismo do paciente [35].

É importante destacar a diferença entre prótese e implante: enquanto a prótese corresponde à coroa do dente, que fica visível acima da gengiva, o implante é análogo à "raiz da prótese". A geometria de um implante é semelhante à de um parafuso, é uma estrutura normalmente metálica cilíndrica que prende o implante à mandíbula [3]. A Figura 15 traz a comparação esquemática entre um dente saudável e um implante sobre prótese.

Figura 15 – Comparação esquemática entre dente e implante.



Fonte: elaborado pelo autor.

Um bom implante deve apresentar as seguintes propriedades [36]:

Módulo de elasticidade: Os materiais escolhidos para confeccionar o implante devem ter módulo de elasticidade semelhante aos dos ossos, para garantir distribuição uniforme do estresse no implante e minimizar o movimento relativo em relação à estrutura de fixação;

Resistência à tração: Implantes devem ter alta resistência à tração e força de compressão para prevenção de fraturas e aumentar a estabilidade funcional;

Maleabilidade: Uma maleabilidade de pelo menos 8% é necessária para um implante dental, isso garante que o material possa ser devidamente moldado;

Dureza e resistência: Aumentar a dureza do material diminui o desgaste do implante e aumentar a resistência previne fraturas;

Resistência à corrosão: É necessário que o material escolhido para confecção do implante seja resistente à corrosão para prolongar sua funcionalidade. Corrosões podem ocorrer por desgaste mecânico, liberação de íons (especialmente no caso de implantes de níquel-cromo) e reações eletroquímicas.

A Tabela 1 classifica os materiais utilizados para confeccionar implantes de acordo com a resposta biológica que cada um desses materiais apresenta [36]. Dizemos que um material é biotolerante quando ele não é necessariamente rejeitado pelo organismo quando implantado, mas é coberto por uma camada fibrosa em forma de cápsula para prevenir reações; materiais bioinertes não interagem com o organismo, podendo ser implantados em contato direto com a estrutura óssea; materiais bioativos são aqueles que permitem a formação de uma nova camada óssea em sua superfície, mas a troca de íons entre o implante e o ambiente criam uma região intermediária de ligação entre a prótese e o osso [37].

Tabela 1 – Classificação de materiais utilizados na confecção de implantes.

Atividade	Tipo de Material		
	Metais	Cerâmicas	Polímeros
Biotolerante	Ouro		Polietileno
	Ligas de Co-Cr		Poliamida
	Aço inoxidável		Acrílico
	Níóbio		Politetrafluoretileno
	Tântalo		Poliuretano
Bioinerte	Titânio comercialmente puro	Óxidos de alumínio	
	Ligas de titânio	Óxidos de zircônio	
Bioativo		Hidroxiapatita	
		Fosfato tricálcio	
		Biovidro	
		Carbono-silício	

Fonte: [36], adaptado.

3.5.1 Implantes de Titânio

Dentre os materiais listados na Tabela 1, o titânio recebe destaque por ser um material bioinerte e apresentar as propriedades acima listadas, de modo que é o material mais utilizado

na confecção de próteses atualmente. Uma característica especial desse material é que ele forma uma camada estável de óxido ao redor da sua superfície que apresenta baixa reatividade [36].

Na forma como é comercializado, os implantes de titânio são classificados em quatro índices que diferem entre si de acordo com a presença de outros metais na composição chamados de "graus de pureza". É comum que haja adição de ferro para aumentar a resistência à corrosão, alumínio para aumentar a dureza e diminuir a densidade, e vanádio para coletar íons de alumínio e prevenir corrosão, além de outros metais [36]. Alguns materiais que não são biocompatíveis podem ser rejeitados pelo corpo ao serem utilizados como implante. Isso se dá pelo fato de não ocorrer uma boa biointegração com o ambiente, fazendo com que o organismo reconheça o implante como um corpo invasor não havendo a osso-integração [38].

A osso-integração é fundamental para o funcionamento correto do implante, uma vez que sem essa ocorrência não há garantia de fixação do pino [38]. O titânio, por ser um material organicamente compatível, apresenta taxa de sucesso de implante na faixa dos 98%. Os 2% de falhas ocorrem principalmente por pacientes que não seguem as recomendações para o pós-operatório ou casos específicos que apresentam dificuldades de cicatrização [39]. Implantes de titânio levam de três a seis meses para serem completamente osso-integrados à mandíbula. Por ser um material leve, resistente e biocompatível com o corpo humano, o titânio é o material mais recomendado para a confecção de implantes e é o tipo de implante mais frequentemente utilizado [39].

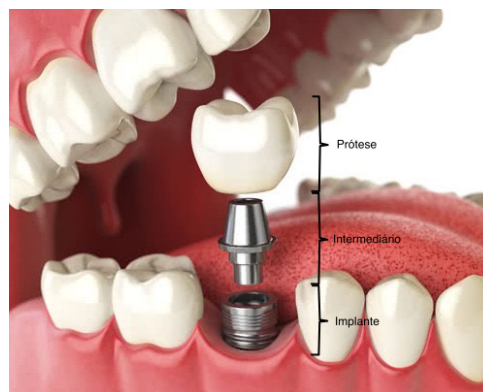
Existem dois tipos básicos de implantes de titânio: implantes de peça única, onde o parafuso é fixado na mandíbula e a prótese é moldada diretamente sobre o pino; ou implantes compostos, que são compostos por três regiões [3]. Nos implantes compostos o parafuso é fixado na mandíbula, mas a prótese é moldada sobre um suporte de titânio que é ligado ao parafuso por meio de uma peça intermediária. Os dois tipos de implantes estão ilustrados na Figura 16.

Figura 16 – Ilustrações de dois tipos de implantes de titânio: de peça única e composto.

(a) Ilustração de implante de peça única.



(b) Ilustração de implante composto.



Fontes: [40,41], adaptado.

3.5.2 Peri-Implantite

Complicações biológicas que afetam implantes osso-integrados se tornaram um assunto de muito foco e discussão na odontologia moderna. A maioria dessas complicações ocorrem por inflamações associadas com ação bacteriológica [2, 42, 43], sendo possível destacar dois casos: a mucosite peri-implantar e a peri-implantite. Acredita-se que a mucosite evolua para a peri-implantite assim como a gengivite evolui para a periodontite [1, 2].

A peri-implantite é uma condição patológica que ocorre nos tecidos ao redor de implantes dentais, caracterizada pela inflamação na mucosa peri-implantar e progressiva perda do suporte ósseo do implante [2, 5]. A inflamação na mucosa é definida pela ocorrência de sangramento ao fazer pressão sobre a região da gengiva que circunda a prótese, o chamado *bleeding on probing* (BOP) [1, 2]. Por definição, diz-se que há inflamação quando o sangramento é detectado para uma força aplicada inferior a 0.25 N [1, 43]. Além do BOP, outra forma de detectar a peri-implantite em um indivíduo é verificar a perda de estrutura óssea por meio de radiografias.

Vale ressaltar que a peri-implantite pode ser iniciada ou sustentada por diversos fatores como excesso de cimento na aplicação do implante, restauração inadequada, mau posicionamento do implante ou demais complicações técnicas [5, 43].

Apesar de serem doenças semelhantes, as principais diferenças entre a peri-implantite e a periodontite são:

Presença de leucócitos e macrófagos: biópsias de tecidos com peri-implantite mostram uma concentração maior dessas células do que tecidos com periodontite [2];

Tamanho de lesões: de modo geral, as lesões causadas pela peri-implantite são maiores do que as de periodontite.

As principais bactérias causadoras da peri-implantite são a *Porphyromonas gingivalis* e *Tannarella forsythia* [2, 44]. Além disso, a ocorrência da doença torna o ambiente inflamado propício para o desenvolvimento de fungos e vírus, o que torna a peri-implantite uma doença de infecção altamente heterogênea [2]. Tais bactérias produzem toxinas ácidas que alteram o pH da cavidade peri-implantar, o que leva à corrosão do implante e, conseqüentemente, à liberação de íons de titânio na saliva e no fluído do sulco gengival [5].

O óxido de titânio é utilizado na confecção de produtos utilizados no dia-a-dia da maioria das pessoas, como remédios, comidas, produtos cosméticos e cremes dentais [5]. Por conta disso, partículas de titânio são encontradas não só em amostras de saliva de portadores de próteses dentais mas também em bocas saudáveis [5, 45]. Entretanto, pesquisas evidenciam que a concentração dessas partículas é maior em amostras oriundas de pessoas que fazem uso de implantes [5, 46–48] e ainda maior em pacientes que sofrem de peri-implantite [5, 49, 50].

Além da corrosão proveniente da ação bacteriana, existem outros efeitos que podem acarretar na liberação de partículas e titânio do implante. Uma possível situação é que o flúor presente em cremes dentais cause dissolução na camada de óxido de titânio protetora do implante e facilite a corrosão do mesmo. A combinação de fatores biológicos, como a ação bacteriana, com fatores químicos e desgaste mecânico podem agravar o quadro de corrosão das próteses [5, 51, 52].

Levando todos esses fatores em conta, a análise foi realizada ao comparar as concentrações elementares detectadas nas amostras de saliva coletadas em diversas regiões da boca de indivíduos portadores de peri-implantite. Uma das regiões de coleta foi o ducto da glândula parótida - uma das glândulas responsáveis por produzir saliva - que foi considerada como amostra de controle para cada indivíduo por conter apenas saliva pura.

3.5.3 Liberação de Titânio

A mera presença de próteses de titânio em ambientes bucais resulta na liberação de partículas de titânio na saliva, como verificado no resultados encontrados por Cleto e colaboradores [53]. Acredita-se que com a corrosão dos implantes causadas por doenças peri-implantares essa liberação é ainda maior [5].

Apesar de ser um material bioinerte com alta taxa de sucesso, existem alguns casos de problemas causados pelo uso de implantes feitos de titânio [54]. Os principais efeitos colaterais que podem ocorrer pela liberação de partículas de titânio decorrem da deposição das partículas corroídas nos tecidos ao redor dos implantes.

A deposição dessas partículas em tecido ósseo pode agravar os casos de peri-implantite, acentuando ainda mais o quadro clínico. Outros exemplos de consequências da liberação de titânio são a "síndrome da unha amarela" e reações alérgicas generalizadas [54].

Uma alternativa para o uso de implantes de titânio são os implantes de zircônia [54, 55]. Nesse tipo de implante tanto o implante quanto a prótese são feitos de óxido de zircônio e, por serem semelhantes à porcelana, aparentam ser mais naturais no ambiente bucal.

3.6 Análise de Fluídos Biológicos

A análise de fluídos biológicos no corpo humano desempenha um papel importante no diagnóstico e prognóstico de doenças [56]. Mudanças na concentração ou composição de um componente bioquímico desses fluídos pode ser utilizada como indicador de uma condição fisiológica ou patológica adversa. Ainda é possível considerar a presença de um elemento "estranho" como um marcador para detecção de uma doença.

Uma grande vantagem de se trabalhar com esses fluídos é detectar doenças a tempo de se fazer um tratamento adequado. Além disso, monitorar a concentração de elementos presentes

em fluídos biológicos durante o período de tratamento de uma doença é vantajoso para averiguar a eficácia do tratamento aplicado. Os fluídos biológicos de maior interesse para análise são: urina, sangue, lágrimas e saliva [56], sendo este último o objeto de interesse do presente trabalho.

3.6.1 Saliva

A saliva é uma secreção glandular que permeia toda a cavidade bucal e é responsável por manter a saúde deste ambiente protegendo tanto os dentes quanto os tecidos moles da boca. Sua composição básica é de 99% de água e 1% de demais substâncias orgânicas e inorgânicas [57]. Dentre as substâncias inorgânicas encontram-se elementos-traço cujo estudo é do interesse deste trabalho. Esses elementos são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do corpo humano [57] ou podem ser indicativos de doenças [57–59].

A análise da composição elementar de amostras de saliva representa uma abordagem não invasiva de obtenção de informações sobre os componentes presentes no corpo humano. Realizar observações sobre este fluído permite monitorar a ação de terapias medicinais e distúrbios patológicos evitando fazer uso de processos invasivos, que muitas vezes podem ser incômodos e até dolorosos para os pacientes. E, por ser um processo indolor, a coleta de saliva para monitoramento contínuo é mais fácil de ser feita do que, por exemplo, a coleta de sangue para verificar os níveis de glicemia em pacientes diabéticos.

Conhecendo a composição elementar de uma amostra de saliva é possível obter informações que revelam a manifestação de uma série de doenças [56], seja pela detecção da doença propriamente dita ou pela detecção da resposta do organismo. Dois casos que podem ser destacados são: detecção de anticorpos do HIV [60]; monitorar a produção da quantidade de amilase salivar de pacientes com fibrose cística [60].

A importância de se entender a presença de elementos-traço no organismo levou ao aumento na necessidade de desenvolver métodos mais precisos para se analisar analiticamente fluídos biológicos [53]. Dentre as técnicas utilizadas para esse fim, a TXRF recebe destaque pois a preparação de amostras para análises é simples e relativamente barata, além de fornecer limites de detecção da ordem de partes por bilhão (ppb) para amostras com volume de alguns μl [28].

3.7 Análise Multivariada

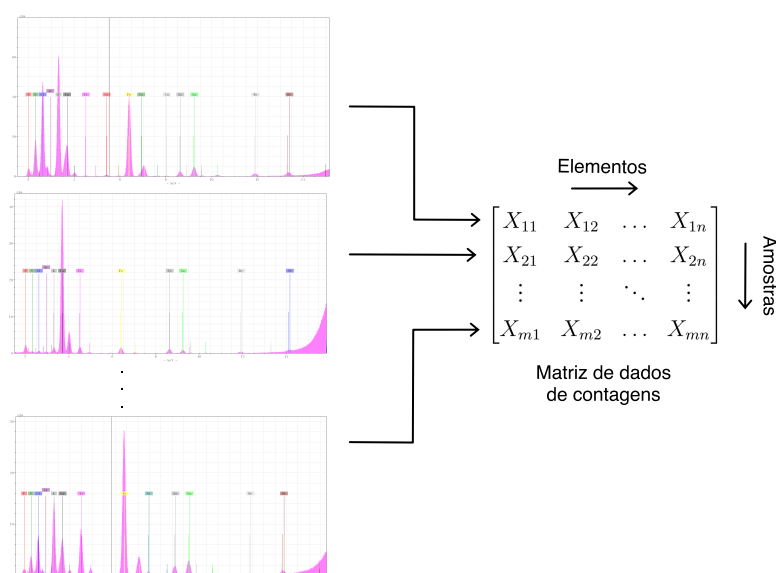
O uso de estatística multivariada permite analisar simultaneamente a ação de muitas variáveis sobre um mesmo sistema, possibilitando extrair muito mais informações de um conjunto de dados. Não só é possível detectar a ação de cada uma das variáveis, mas também da inter-relação entre elas [61]. Com isso, é vantajoso aplicar a estatística multivariada sobre dados de análise espectroscópica visto que dessa forma é possível analisar os resultados obtidos com

maior precisão, fazer modelagens na presença de elementos interferentes e extrair informações que não estejam explícitas [62]. Uma vertente da química designada para esse tipo de estudo é a quimiometria, uma ciência inerentemente multidisciplinar que faz uso de métodos matemáticos e estatísticos para resolver e prever problemas, principalmente de ciências naturais experimentais. Portanto, os métodos quimiométricos podem ser utilizados para diversas finalidades, como planejamento e otimização de experimentos, processamentos de sinais analíticos, classificação de dados, análise exploratória baseada em reconhecimento de padrões, calibração multivariada, entre outros [63]. Para a realização deste trabalho apenas a análise exploratória foi aplicada, mais precisamente a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*).

3.7.1 Pré-Processamento de Dados

Antes de realizar a análise multivariada é necessário organizar os dados que serão analisados e recomenda-se fazer ainda um pré-tratamento e/ou pré-processamento dos dados com o intuito de reduzir variações indesejáveis que podem enviesar os resultados [62]. Para a análise espectral, os dados obtidos para cada amostra são organizados na forma de uma matriz $\mathbf{X}_{n \times m}$ cujas linhas (n) representam as amostras e as colunas (m) representam as variáveis (no caso da TXRF, podem ser tanto as contagens detectadas pelo sistema quanto as concentrações calculadas para cada elemento). A Figura 17 relaciona um espectro com a matriz de dados gerada.

Figura 17 – Organização de uma matriz de dados para análise de espectros.



Fonte: elaborado pelo autor.

Enquanto os pré-tratamentos (alisamentos, derivadas, etc.) são aplicados às linhas da matriz isto é, sobre as amostras, os pré-processamentos (autoescalamento, centragem na média, etc.) são aplicados sobre as colunas, ou seja, as variáveis. Nos dados coletados para este tra-

balho, o pré-processamento aplicado foi o autoescalamento, que é recomendado nos casos em que as variáveis são expressas em diferentes escalas ou há grande variação nos dados. O intuito desse pré-processamento é igualar o potencial de cada variável para minimizar o efeito de uma variável dominante [62, 64]. No autoescalamento, as variáveis são centradas na média e posteriormente divididas pelo seu desvio padrão de modo a limitar os valores ao intervalo $[-1, 1]$. A Equação (3.21) descreve este processo matemático,

$$Z = \frac{X - \bar{X}}{\sigma}, \quad (3.21)$$

onde Z é o valor autoescalado, X é o valor original, \bar{X} é a média aritmética calculada para cada variável e σ o desvio padrão deste conjunto.

3.7.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

No contexto da química e, portanto, da quimiometria, a Análise de Componentes Principais é considerada a técnica de análise multivariada mais difundida e indicada para análise e identificação de padrões [63, 64]. A ideia principal por trás da PCA é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados que contém um número muito grande de variáveis inter-relacionadas, preservando ao máximo a variação presente no conjunto de dados [65]. Tal feito é possível ao transformar as variáveis do conjunto em um novo conjunto, o das componentes principais (PC, do inglês *principal components*), que não são correlacionadas e devem ser ordenadas de modo que as primeiras PC's retenham a maior parte das variações presentes no conjunto original.

Idealmente, o número de PC's será igual ao número de componentes significantes e cada PC é caracterizada por duas grandezas: os *scores* e os *loadings*. No contexto das análises espectrométricas, os *scores* representam as amostras analisadas no novo sistema de coordenadas e os *loadings* são os coeficientes de combinação linear que representam o quanto cada variável original contribui para a construção de cada PC [62, 63]. Ao confeccionar um gráfico dispondo apenas dos *scores* é possível ver se há formação de agrupamentos entre as amostras analisadas e, ao adicionar a informação dos *loadings*, torna-se possível também verificar quais são os elementos responsáveis por esses agrupamentos.

Na literatura existem diversos procedimentos para fazer a conversão da matriz de dados original para o sistema de componentes principais. Dentre os principais é possível destacar a decomposição por valores singulares (SVD, do inglês *Singular Value Decomposition*) e diagonalização da matriz de correlação. O método utilizado nesse trabalho foi o SVD. Em termos matriciais, o procedimento para conversão dos dados originais para o espaço de componentes principais consiste em converter uma matriz $\mathbf{X}_{m \times n}$ em duas matrizes menores $\mathbf{T}_{m \times 2}$ e $\mathbf{P}_{n \times 2}$ somada a uma matriz de resíduos $\mathbf{E}_{m \times n}$ [66]. Isto é,

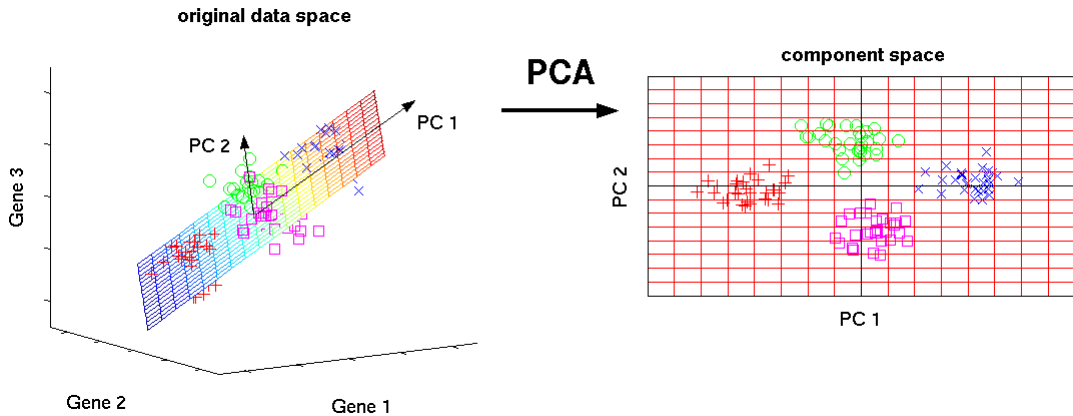
$$\mathbf{X}_{m \times n} = \mathbf{T}_{m \times 2} \mathbf{P}_{n \times 2}^T + \mathbf{E}_{m \times n}, \quad (3.22)$$

ou,

$$\begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ X_{m1} & X_{m2} & \dots & X_{mn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} T_{11} & T_{12} \\ T_{21} & T_{22} \\ \vdots & \vdots \\ T_{m1} & T_{m2} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} & \dots & P_{1n} \\ P_{21} & P_{22} & \dots & P_{2n} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} E_{11} & E_{12} & \dots & E_{1n} \\ E_{21} & E_{22} & \dots & E_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ E_{m1} & E_{m2} & \dots & E_{mn} \end{bmatrix} \quad (3.23)$$

Cada linha da matriz de dados original, $\mathbf{X}_{m \times n}$, é considerada como um ponto no espaço n -dimensional que é criado com a aplicação da SVD. Uma forma de visualizar essa redução de dimensões está ilustrada na Figura 18, onde dados projetados tridimensionalmente são convertidos para um sub-espaço bidimensional no sentido da maior variância (PC1), para facilitar a identificação de padrões.

Figura 18 – Exemplo de redução dimensional pela aplicação da PCA.



Fonte: [66]

Os resultados obtidos para a PCA realizados nesse trabalho estão dispostos e discutidos no Capítulo 6 e o código utilizado para realização da análise, em Python, está disposto e comentado no Apêndice A.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na literatura, não existem muitos artigos que façam uso de técnicas espectroscópicas de raios X para estudo de doenças. Dentre as fontes estudadas para a confecção do presente trabalho, destacaram-se as pesquisas realizadas por Cleto [53], Poletto [57], Mercan [46], Safi-oti [49], Soler [5], Abraham [67] e respectivos colaboradores. Esses trabalhos foram escolhidos para nortear a confecção da presente dissertação por utilizarem técnicas iguais ou semelhantes à empregada pelo autor e por apresentarem resultados que poderiam ser verificados em laboratório ou complementados pelos resultados obtidos.

Em 2016, Cleto e colaboradores [53] aplicaram a técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) sobre amostras de saliva coletadas em duas regiões da boca de sete pacientes escolhidos aleatoriamente: no ducto da glândula parótida e no sulco entre os dentes 46 e 47. O objetivo dos pesquisadores era de utilizar a TXRF para avaliar qualitativamente os resultados. Os elementos químicos encontrados nas amostras coletadas em ambas as regiões foram fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), titânio (Ti), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), bromo (Br), rubídio (Rb) e chumbo (Pb). Apesar de vários elementos terem sido identificados, nem todos os elementos foram encontrados nas amostras de todos os pacientes em estudo. Ao comparar os resultados qualitativos obtidos para as amostras de saliva e da parótida, foi possível verificar elementos presentes na saliva coletada do sulco que não aparecem na glândula parótida. De modo que a análise utilizada é satisfatória para identificar os elementos contidos nas amostras de cada região, o que torna a TXRF uma boa técnica de análise de amostras de saliva.

Em 2020, Poletto e colaboradores [57] analisaram a relação entre os elementos-traço contidos em amostras de saliva de crianças e a presença de cáries dentais por meio da TXRF. Amostras de 120 crianças (60 saudáveis e 60 com cáries) foram coletadas na faixa etária de 3 a 6 anos de idade de ambos os sexos que participaram do programa de educação de saúde oral preventiva na Universidade Estadual de Londrina. Estudos anteriores [59, 68–73] indicam que os elementos-traço comumente relacionados com cáries dentais são alumínio (Al), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). Os pesquisadores verificaram que nas amostras do grupo acometido por cáries, as concentrações de Mn e Fe eram significativamente maiores do que no grupo saudável. Portanto, os resultados sugerem uma relação entre os elementos-traço verificados e cáries dentais, indicando um possível envolvimento destes elementos no metabolismo dos microrganismos envolvidos no surgimento da cárie.

Por mais que o titânio seja um material altamente inerte, é possível que ele sofra corrosão ao ficar em contato com a cavidade bucal. Esse foi o resultado verificado em um estudo realizado por Mercan e colaboradores [46], que consistia na análise de amostras de gengiva

por meio de espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado por ablação de laser (LA-ICP-MS). Usando 22 pacientes que usaram implante por 3 meses como grupo de teste e 10 voluntários como grupo de controle, os pesquisadores verificaram uma concentração média de titânio maior para o grupo de teste do que o grupo de controle. Entretanto, a diferença detectada não é considerada significativa e os autores sugerem que mais pesquisas devem ser realizadas sobre o assunto.

A peri-implantite é uma doença que pode ser desenvolvida por usuários de implantes dentais e é representada por uma perturbação na interface biocompatível entre a camada de dióxido de titânio na superfície do implante e os tecidos peri-implantares. Motivados pelo assunto, Safioti e colaboradores [49] levantaram a hipótese de que existe uma relação entre a dissolução de titânio em implantes dentários (o que sugere corrosão) e a ocorrência de peri-implantite em humanos. Os pesquisadores analisaram 40 amostras de placa submucosa ao redor de implantes, divididas entre um grupo saudável e um grupo com incidência de peri-implantite. Os níveis de titânio foram analisados usando espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os resultados mostram que a concentração de titânio para os pacientes com peri-implantite eram maiores do que para o grupo saudável, o que indica uma relação entre a dissolução de titânio e a ocorrência de peri-implantite.

Titânio sofre corrosão ao estar exposto à ação bacteriana. Por conta disso, em 2020 Soler e colaboradores [5] investigaram esse fenômeno como função das partículas de titânio encontradas em tecidos coletados em pacientes que sofrem de peri-implantite, uma vez que a doença é causada por bactérias. As amostras foram coletadas de oito pacientes para serem processadas e mergulhadas em resina para posterior análise usando espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e microscopia eletrônica (SEM). Em cinco das oito amostras coletadas verificou-se a presença de partículas de titânio no tecido mole.

A corrosão de metais implantados em biomateriais é esperada. Como fluídos biológicos são ricos em íons quimicamente ativos, processos eletroquímicos começam a ocorrer na superfície do implante metálico imediatamente após a instalação. O trabalho realizado por Abraham e colaboradores [67] analisou amostras de fluídos orais de usuários de implantes metálicos utilizando TXRF induzido por radiação síncrotron para determinar as concentrações de íons metálicos presentes nas amostras devido à ação de degradação dos implantes. Os resultados obtidos mostram que íons de titânio apresentam maior concentração no fluído gengival do que na saliva total, indicando que há uma deposição desses íons no tecido gengival.

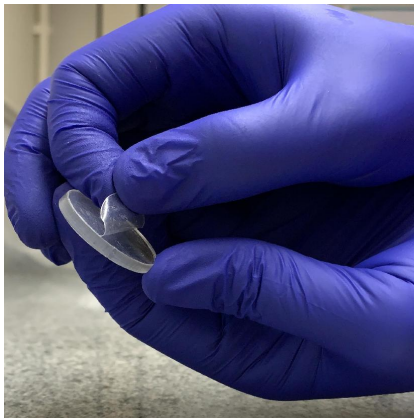
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Porta-Amostra

O porta-amostra utilizado para análise das amostras de saliva é do tipo pastilha cilíndrica com diâmetro de 3 cm e espessura de 3 mm. É vantajoso trabalhar com esse tipo porta-amostra pois os discos são baratos e descartáveis e ocorre pouca detecção de elementos do disco no espectro obtido pela análise das amostras. Antes das amostras serem depositadas, é necessário retirar uma fina película protetora do disco que impede contaminação do disco e, conseqüentemente, da amostra. Tal película pode ser vista sendo retirada na Figura 19a. Para que as amostras sejam preparadas, o equipamento de análise acompanha um suporte de preparo onde o disco é posicionado e apresenta um ponto central para indicar a posição onde a amostra deve ser depositada, vide Figura 19b.

Figura 19 – Película protetora do disco sendo retirada e porta-amostra sobre suporte de preparação .

(a) Película protetora sendo retirada.



(b) Disco sobre suporte de preparação.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Coleta das Amostras

Para a realização deste trabalho, foram coletadas amostras de salivas em várias regiões da boca de pacientes que apresentaram peri-implantite. A Tabela 2 traz algumas informações básicas sobre todos os pacientes analisados.

Tabela 2 – Características gerais dos pacientes analisados.

Paciente	Descrição
Paciente A1	Homem adulto que fez uso de implantes por vários anos antes de precisar trocar devido à peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente A2	Homem adulto que ao longo da vida já perdeu seis implantes para infecções peri-implantares. Além da peri-implantite também sofre com tártaro.
Paciente A3	Mulher adulta que faz uso de vários implantes, apresentando sulcos saudáveis, com mucosite peri-implantar e peri-implantite.
Paciente A4	Homem adulto que fez uso de implantes por vários anos antes de precisar trocar devido à peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente B1	Homem adulto que fez uso de implantes por vários anos antes de precisar trocar devido à peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente B2	Mulher adulta com vários implantes em boca. A substituição foi necessária por perda de estrutura óssea e mal-posicionamento dos implantes.
Paciente B3	Mulher adulta portadora de ELA que faz uso de implante de óxido de zircônio. O implante foi perdido mas sem sinais aparentes de peri-implantite.
Paciente C1	Mulher adulta que fez uso de implantes por vários anos antes de precisar trocar devido à peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente C2	Homem adulto que fez uso de implantes por vários anos antes de precisar trocar devido à peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente C3	Homem adulto com histórico de perda de implantes para doenças peri-implantares. Apresenta boa saúde bucal.
Paciente Controle	Homem adulto que faz uso de implantes há vários anos sem traços de peri-implantite. Apresenta boa saúde bucal.

Os dez primeiros pacientes foram divididos em grupos em função das regiões cujas coletas foram feitas, sendo eles:

Grupo 1 Pacientes afetados por peri-implantite cujas amostras de saliva foram coletadas em diferentes regiões da boca;

Grupo 2 Pacientes que perderam um ou mais implantes cujas amostras de saliva foram coletadas em diferentes regiões de um implante que foi perdido;

Grupo 3 Pacientes afetados por peri-implantite que tiveram amostra de tecido gengival coletada além das amostras de saliva.

As Tabelas de 3 a 5 relacionam os pacientes que concordaram em participar da pesquisa com os locais de onde as amostras foram coletadas. O conjunto de coletas para cada paciente é heterogêneo pois dependeu da disponibilidade de cada uma das regiões.

Tabela 3 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 1.

Região de Coleta	Paciente			
	A1	A2	A3	A4
Duto da glândula parótida	X	X	X	X
Sulco de implante saudável	X	X		X
Interior de implante	X			X
Sulco de implante com peri-implantite	X	X	X	X
Saliva total		X	X	
Sulco de mucosite peri-implantar			X	

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 2.

Região de Coleta	Paciente		
	B1	B2	B3
Superfície do implante	X	X	
Ápice do implante	X	X	X
Corpo do implante	X	X	X
Corpo do implante com sangue			X
Implante como um todo	X	X	X

Fonte: elaborado pelo autor.

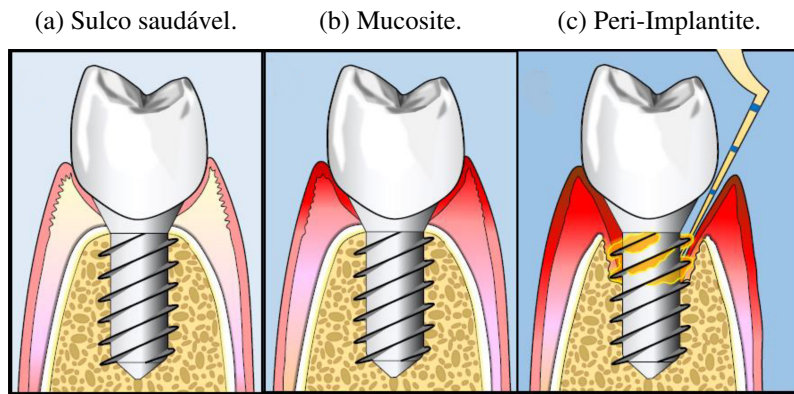
Tabela 5 – Relação entre pacientes e amostras coletadas para o Grupo 3.

Região de Coleta	Paciente		
	C1	C2	C3
Sulco de implante com peri-implantite	X	X	
Corpo do implante			X
Saliva total	X	X	X
Sulco de um dente	X	X	X
Tecido gengival	X	X	X

Fonte: elaborado pelo autor.

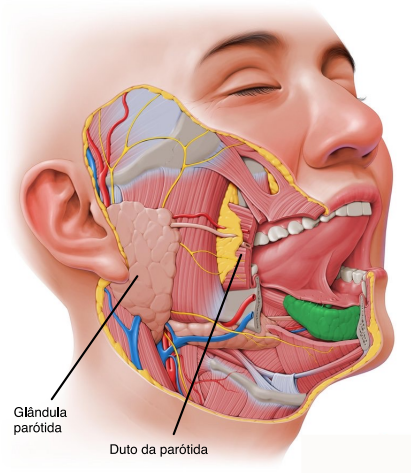
A Figura 20 ilustra as regiões de coleta para o sulco gengival de um implante saudável (20a), uma região de mucosite peri-implantar (20b) e um implante acometido por peri-implantite (20c). Além disso, a Figura 21 indica onde está localizada a glândula parótida e o duto que a liga até a boca por onde a saliva produzida é transportada, e a Figura 22 representa as diferentes regiões de coleta feitas sobre implantes.

Figura 20 – Regiões de coleta em sulco peri-implantar.



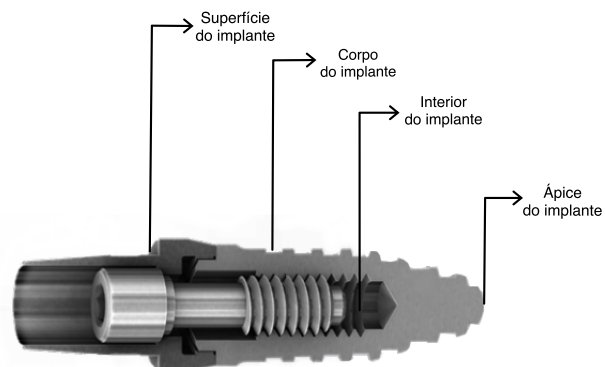
Fonte: [74], adaptado.

Figura 21 – Localização da glândula parótida e o duto que leva a saliva produzida até a boca.



Fonte: [75], adaptado.

Figura 22 – Regiões de coleta de amostra em implantes.



Fonte: [76], adaptado.

5.3 Preparação das Amostras

Para cada região, foram coletados 10 μL de saliva com uma micropipeta e ponteiros descartáveis estéreis (Figura 23) para preparação das amostras. O volume de saliva foi então imediatamente depositado sobre uma das superfícies dos discos de acrílico descritos na Seção 5.1 após a retirada da película protetora. Quando o conjunto de amostras para cada paciente ficou pronto, eles foram depositados sobre um suporte confeccionado especificamente para secagem de amostras líquidas para TXRF.

Figura 23 – Micropipeta com ponta estéril descartável semelhante à utilizada para coleta das amostras.



Fonte: elaborado pelo autor.

Vale ressaltar que durante todo o preparo das amostras foram utilizadas máscaras e luvas sem talco, desde a coleta até a medição no espectrômetro, para evitar contaminação das amostras. Ao contrário das amostras de saliva, a coleta do tecido gengival dos pacientes do Grupo 3 foi feita por meio de raspagem do tecido, a Figura 24 ilustra uma lâmina de aço inoxidável tamanho 15C da Swann Morton, o tipo de lâmina utilizada para este conjunto de coletas. A metodologia de coleta é semelhante à utilizada no exame de Papanicolau, realizada para detecção de câncer de colo de útero [77]. A região da gengiva foi raspada pela lâmina, de modo a coletar células de tecido gengival sobre esta, que posteriormente foram raspadas sobre os porta-amostras (esfregaço de Nicolau) para secagem e posterior análise.

Figura 24 – Tipo de lâmina utilizada para raspagem de tecido gengival.

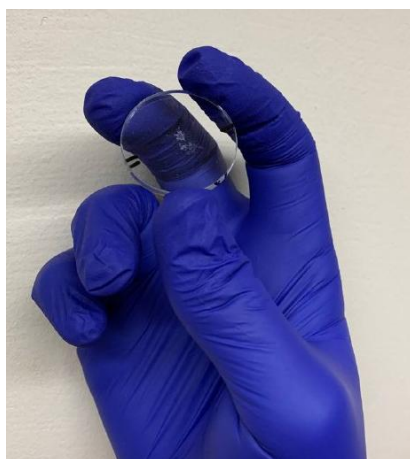


Fonte: [78]

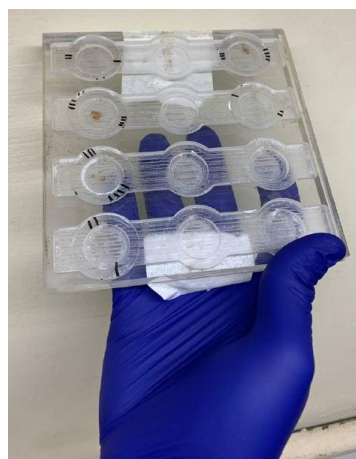
O suporte contendo os discos foi levado a uma estufa para que ocorresse a secagem das amostras. Os discos foram mantidos no forno a uma temperatura de 55°C por aproximadamente 35 minutos. O procedimento de preparo realizado foi baseado no descrito por De La Calle e colaboradores [79] que é chamado de *procedimento direto sem tratamento*. As Figuras 25a e 25b ilustram um disco de amostra após a secagem e estojo utilizado para secar, armazenar e transportar as amostras, respectivamente. O estojo de discos foi confeccionado especificamente para este fim e é composto de um material que não sofre derretimento ao ser expostos às temperatura de secagem da estufa e é capaz de suportar até doze discos de amostras por vez.

Figura 25 – Disco contendo amostra e estojo utilizado para armazenar discos.

(a) Disco com amostra seca pronta para a análise.



(b) Estojo utilizado para armazenar discos de amostra.



Fonte: elaborado pelo autor.

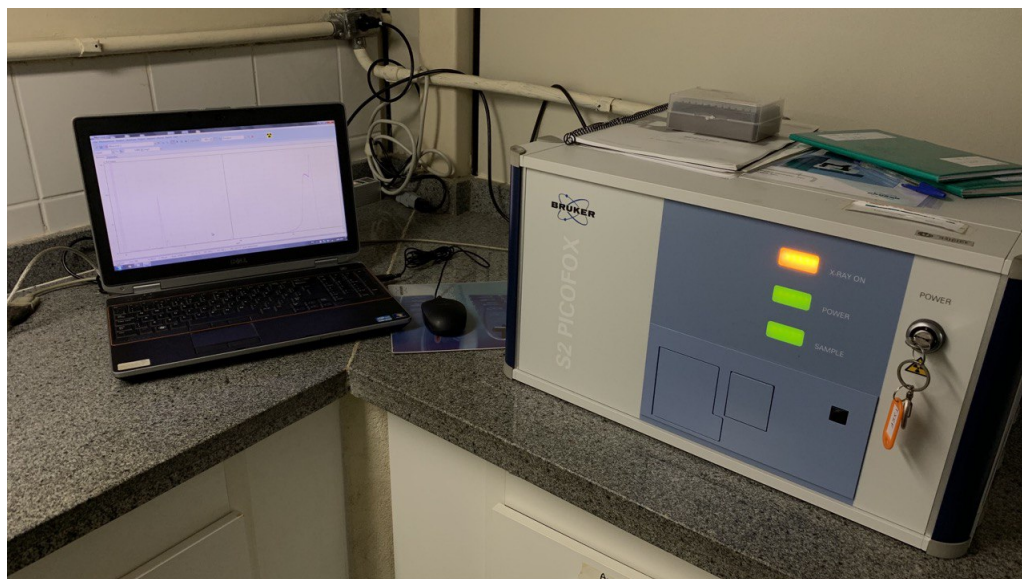
5.4 Sistema S2 PICOFOX

O Sistema S2 PICOFOX, produzido pela Bruker Nano GmbH (Berlim, Alemanha) é uma espectrômetro de mesa transportável destinado para microanálises quantitativas e semi-quantitativas multi-elementares rápidas e precisas de amostras utilizando os princípios da TXRF, apresentando limites de detecção no intervalos de ppm a ppb [34]. Como o aparelho não necessita de refrigeração criogênica, é relativamente compacto e pode ser levado para análises *in situ* desde que haja um fonte de energia. A Figura 26 traz uma foto do espectrômetro ao lado do computador utilizado para o processamento dos dados obtidos com o espectrômetro.

Os maiores benefícios do uso deste aparelho são: (i) Limites de detecção na faixa de ppm a ppb; (ii) Análise de elementos traço multi-elementar simultânea; (iii) Análise de amostras com tamanho reduzido, no intervalo de ng a μg ; (iv) Quantificação utilizando padrão interno; (v) Aplicável em várias situações de análise e tipos de amostra; (vi) Ausência de efeitos de matriz; e (vii) Baixo custo de operação. As áreas principais em que o S2 PICOFOX pode

ser aplicado são: análise ambiental; controle de qualidade; ciências de materiais; indústria de semicondutores; medicina e biotecnologia.

Figura 26 – Foto do sistema S2 PICOFOX utilizado ao lado do notebook responsável por fazer a análise de dados.



Fonte: elaborado pelo autor.

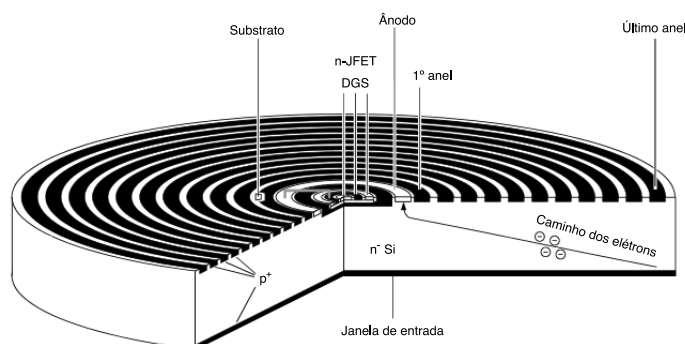
Existem duas versões básicas deste aparato que variam de acordo com o tipo do trocador de amostras. O modelo manual suporta um disco de análise por vez, e deve ser trocado manualmente cada vez que uma nova amostra for analisada. O modelo automático conta com um suporte para até 25 amostras simultâneas que são analisadas sequencialmente. Há ainda um versão de alta eficiência, que é cerca de cinco vezes mais sensível do que a versão básica, sendo esta a utilizada para a realização do trabalho.

O tubo de raios X utilizado na máquina é o modelo MCB50-0.7G, da rtw Röntgen-Technik Dr. Warrikhoff GmbH & Co.KG. O tubo é feito de metal e cerâmica e é equipado com um cátodo aterrado. O ânodo do tubo é feito de molibdênio e é refrigerado por um cooler de ar. A angulação do ânodo é de 6° com a direção do feixe de elétrons incidente e apresenta uma janela de berílio de $100\ \mu\text{m}$. Além disso, a tensão, a corrente e a potência máximas que podem ser aplicadas sobre o tudo são 50 kV, $600\ \mu\text{A}$ e 30 W, respectivamente.

O detector de raios X utilizado é um detector semicondutor do tipo SDD (do inglês, *Silicon Drift Detector*). Esse tipo de detector é escolhido por apresentar um baixo ruído eletrônico e um baixo *shaping time*, isto é, processa rapidamente o sinal recebido. O SDD é composto por um substrato de silício encrustado com eletrodos tipo $p+$ (cátodos) de potenciais distintos, gerando um campo elétrico natural dentro do detector, e um eletrodo $n-$ (ânodo). Quando um elétron atinge o substrato, ocorre a formação de um par elétron-buraco na estrutura cristalina do semicondutor, que é levado em direção ao eletrodo $n-$ por ação do campo elétrico formado no interior do cristal pelos anéis existentes na superfície do detector, onde é feita a contagem da radiação recebida.

A estrutura de um detector SDD com um transistor JFET de n canais integrado está ilustrada na Figura 27, onde o portão do transistor está conectado ao anel do ânodo por uma faixa de metal. Vale ressaltar que a janela de entrada do detector deve ser suficientemente fina para que a energia dos fótons incidentes não sejam absorvidas antes de entrar em contato com o cristal de silício [27].

Figura 27 – Corte transversal de um detector SDD.



Fonte: [27], adaptado.

Na Figura 28 está ilustrado um diagrama de blocos que demonstra o funcionamento do S2 PICOFOX e seus módulos de operação, sendo cada um deles:

PreA pré-amplificador de sinal embutido no detector;

XDSP processador principal para medição, operação, controle e manutenção do sistema;

XSYS interface do sistema, circuitos de segurança para controle do gerador e luzes de aviso;

XSPV amplificador do sinal e cancelador de tempo morto;

XNETZ geração e fornecimento de voltagem do sistema, controle de temperatura do detector;

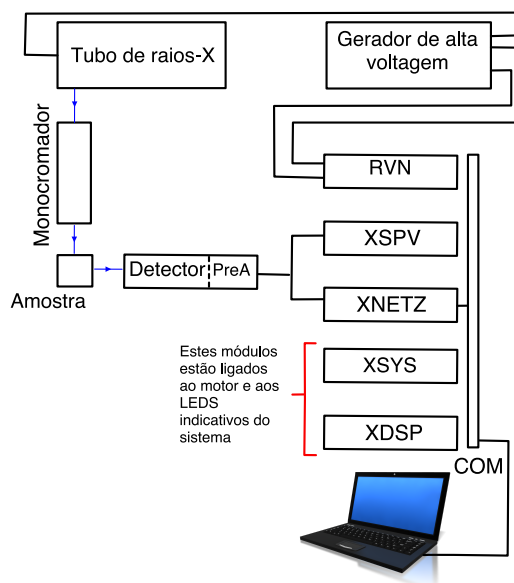
RVN interface para o gerador de alta voltagem.

Com as informações coletadas, o software é responsável por gerar um espectro de energias para análise, onde é possível configurar o tempo de irradiação na amostra, introduzir os elementos identificados e fazer a desconvolução dos picos sobrepostos.

Para a realização das medidas, o sistema S2 PICOFOX foi ligado aproximadamente uma hora antes de ser utilizado para que o tubo tivesse tempo de se estabilizar e não comprometer as medidas.

Após preparadas e secas, as amostras foram irradiadas por um *live time* de 100 segundos. Para garantir homogeneização dos resultados, todas as amostras foram medidas em triplicata sendo rotacionadas manualmente em cerca de 120°. Como não houve interesse em identificar *quanto* de cada elemento estava presente nas amostras para comparar com algum

Figura 28 – Diagrama de blocos do S2 PICOFOX.



Fonte: elaborado pelo autor.

tipo de padrão ou norma, mas apenas de identificar a presença dos elementos, as análises realizadas foram puramente qualitativas. Por isso, os valores analisados nos capítulos seguintes são os das contagens medidas pelo detector (área líquida dos picos dos espectros) e não os das concentrações.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Elementos Detectados

O valor das contagens obtidas para cada elemento nas amostras de saliva é obtido pelo *software* Spectra 7 e calculado a partir das contagens totais para cada valor de energia subtraindo-se as contagens de fundo. Os principais elementos medidos nas amostras de saliva foram: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Co, Ni, Zn, As, Se, Br e Rb. Além destes ainda foram encontrados V, Mn, Cu e Ba, mas apareceram em uma quantidade muito baixa de amostras. Os elementos encontrados estão de acordo com os verificados anteriormente na literatura por trabalho semelhantes, como o de Cleto e colaboradores [53].

Nas próximas seções os resultados obtidos para cada um dos pacientes serão discutidos individualmente, discutindo possíveis causas para as contagens detectadas ao tentar relacionar os elementos com a infecção ou com a resposta do organismo para a infecção com base em resultados verificados na literatura. Para preservar a identidade dos envolvidos todos os pacientes serão identificados por números ao invés de nomes.

Para cada paciente será ilustrada uma tabela contendo os valores de contagem medidos e um gráfico de barras para cada elemento detectado nas diferentes regiões, feito utilizando o programa Python e a biblioteca matplotlib, para observar o comportamento dos dados. O valor σ indicado nas Tabelas 6 a 16 correspondem à incerteza dos valores de contagens para cada elemento, como fornecido pelo Spectra 7 ao realizar a análise das amostras. Há ainda um dos espectros obtidos para cada paciente para complementar a visualização. A presença do argônio se deve à atmosfera dentro da câmara de medição e a presença de gálio é fruto de adição de padrão interno para determinação das concentrações elementares presentes nas amostras. Como não houve desejo de quantificar tais valores, a influência deste elemento pode ser desconsiderada. Os valores de contagens dizem respeito às áreas líquidas dos picos de cada elemento.

6.2 Grupo A

Nessa seção serão avaliados e discutidos os resultados obtidos para os pacientes que fazem parte do Grupo 1, isto é, aqueles cujas amostras de saliva foram coletadas em diferentes regiões da boca para identificar quais elementos são relacionados com a ação da peri-implantite. A presença de cada elemento será justificada com base em dados estudados na literatura, quando possível. Para este grupo o objetivo é comparar a composição elementar das amostras de sulco de implantes acometidos por peri-implantite com as demais para cada paciente.

6.2.1 Paciente A1

O primeiro paciente cuja saliva foi coletada é um homem adulto que no momento na coleta fazia uso de implante há 15 anos, o implante deste paciente teve que ser trocado devido ao desgaste causado pela peri-implantite. As contagens verificadas para cada região de coleta estão listadas na Tabela 6 e ilustradas na Figura 29. Além disso, a Figura 30 traz um dos espectro obtidos para a amostra de região de peri-implantite desse paciente.

Tabela 6 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A1.

	Parótida		Peri-Implantite		Sulco Saudável		Interior	
Si	—		—		—		2300	±50
P	24820	±150	10120	±110	19020	±140	18670	±150
S	30980	±190	62900	±300	9040	±110	38000	±200
Cl	232000	±500	175000	±400	237500	±500	133000	±400
K	536000	±700	224900	±500	649000	±800	249000	±500
Ca	92200	±300	23780	±200	140000	±400	106000	±300
Ti	6800	±90	600	±30	1000	±40	13700	±120
Fe	1730	±40	223000	±500	14810	±120	11340	±100
Ni	—		—		—		550	±20
Cu	—		670	±20	—		1900	±50
Zn	179500	±400	22100	±150	12200	±110	201300	±450
Se	—		—		—		235	±15
Br	42400	±200	9520	±100	53800	±200	10110	±100
Rb	19270	±170	11490	±150	21450	±170	10000	±100

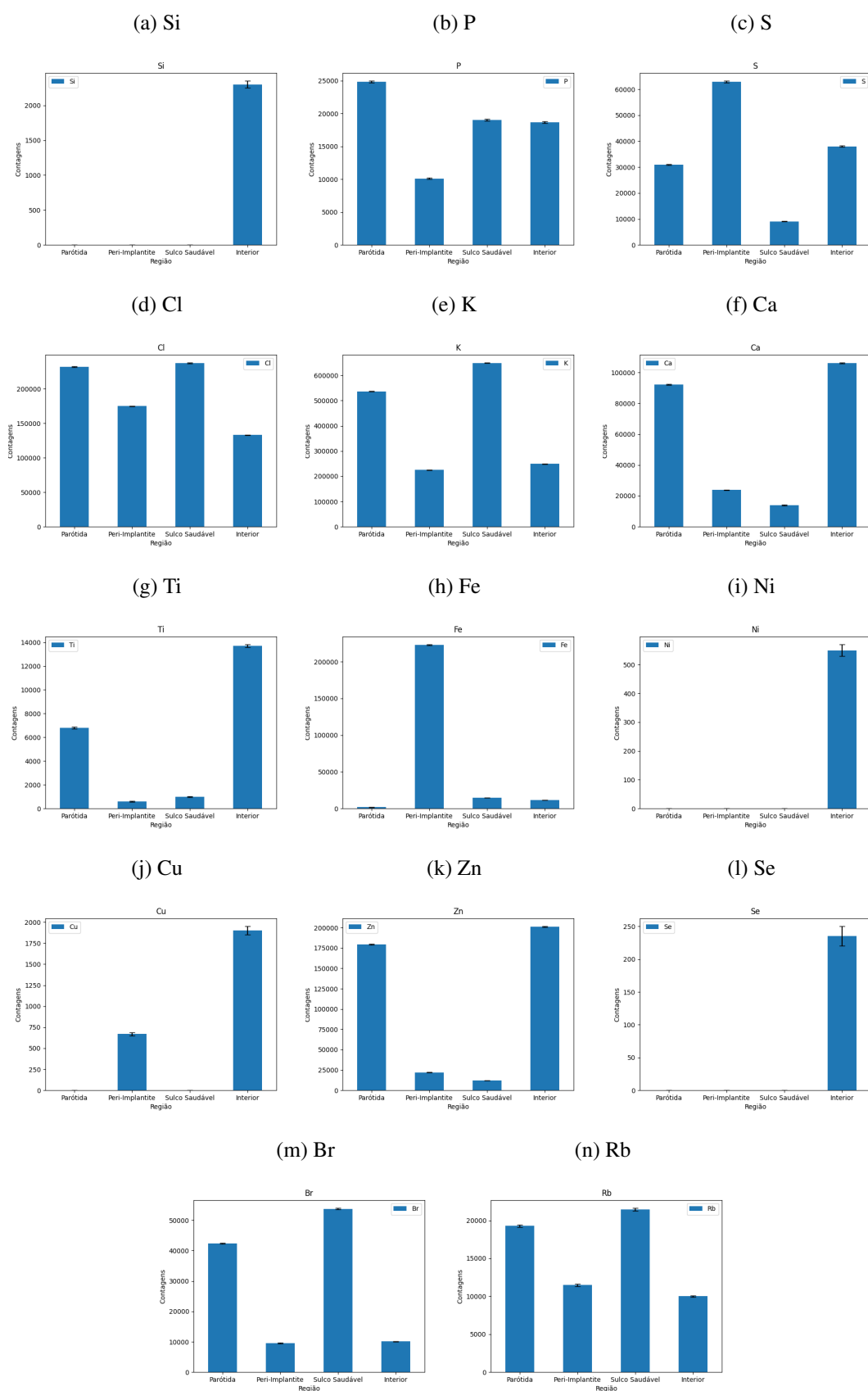
Fonte: elaborado pelo autor.

A glândula parótida é uma das glândulas responsáveis pela produção de saliva na boca humana, por conta disso a saliva coletada diretamente na saída do duto que liga essa glândula à boca é considerada pura, visto que sua composição será um reflexo da saúde do paciente. Para os fins deste trabalho, as contagens verificadas nessa região servem de controle para as demais regiões analisadas.

Na região de coleta do sulco de um implante acometido por peri-implantite, onde verificou-se supuração no momento da coleta, é possível notar que as concentrações de ferro e enxofre são mais altas do que nas demais regiões (Figuras 29h e 29c). O alto número de contagens de ferro nessa região pode ser resultante da maior presença de macrófagos, que são células responsáveis por combater doenças e infecções [80]. A elevada contagem de enxofre é também um resultado da infecção, uma vez que micro-organismos como a *Porphyromonas gingivalis* produzem uma série de compostos à base de enxofre [81]. Além disso, a presença do cloro também pode estar relacionada com a resposta à inflamação [82].

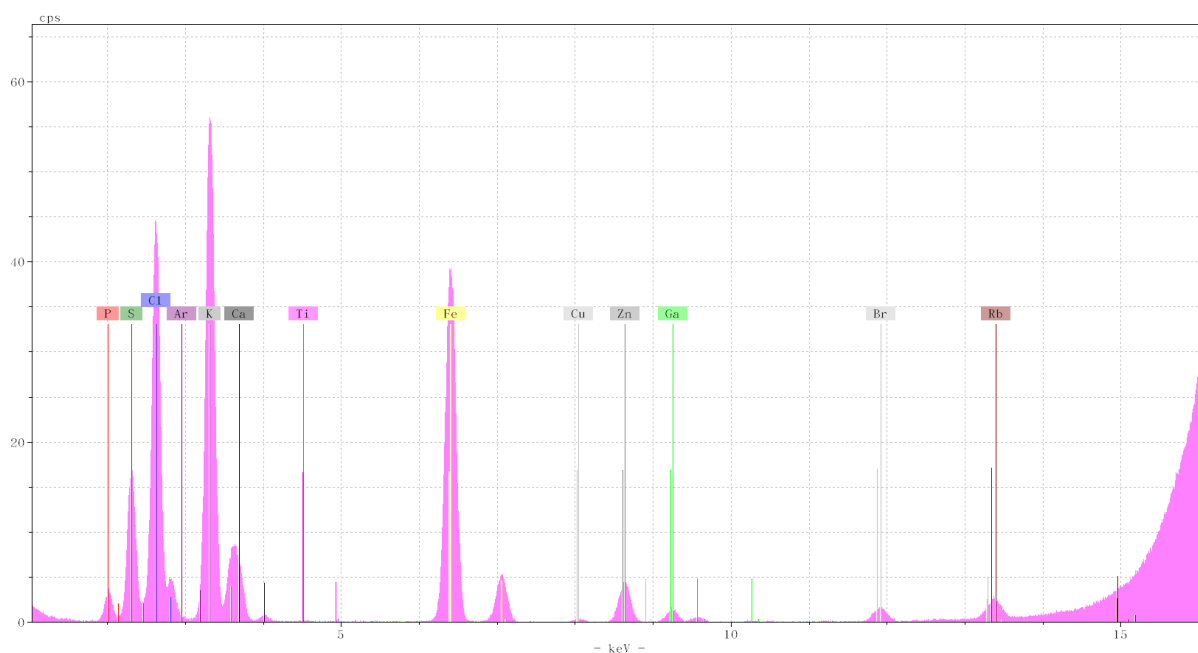
A amostra coletada no interior do implante removido apresenta maiores contagens de titânio e zinco (Figuras 29g e 29k) do que as demais regiões. Uma das principais funções do zinco no ambiente bucal é a de combater bactérias anaeróbicas [83]. Além disso, como indicado

Figura 29 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A1.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 30 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A1.



Fonte: elaborado pelo autor.

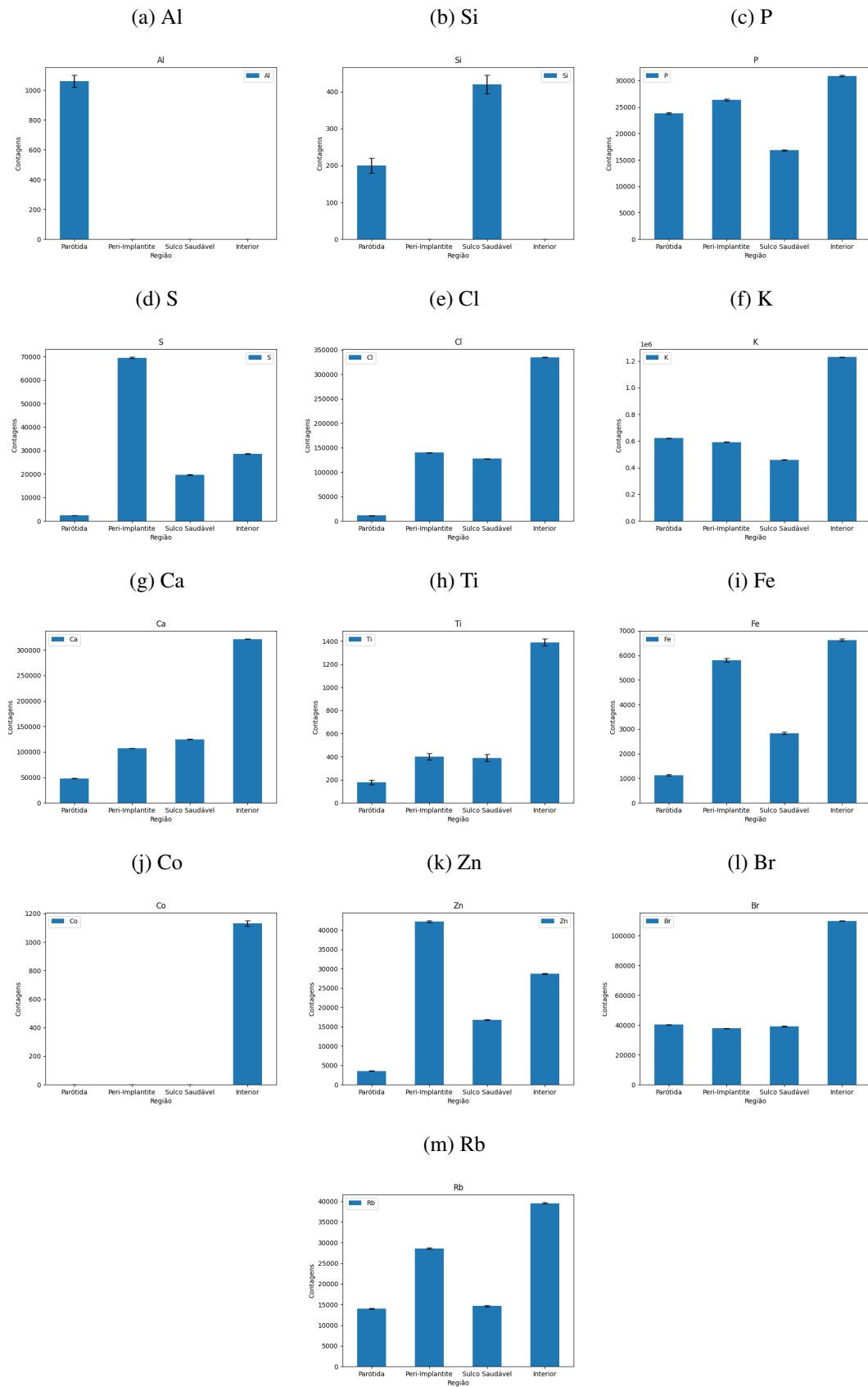
na Tabela 6 não há variação significativa nas contagens de titânio verificadas entre o sulco saudável e o sulco doente, o que indica que o titânio liberado por meio de corrosão não fica em suspensão na saliva do sulco. Como verificado por Soler e associados [5] ao analisar amostras de tecido gengival de pacientes com peri-implantite, há uma concentração maior de titânio em sulcos gengivais acometidos por peri-implantite. Esse resultado, associado com as contagens aqui verificadas, sugerem que o titânio corroído pela doença é depositado nas gengivas ao invés de ficar em suspensão na saliva.

6.2.2 Paciente A2

Assim como o primeiro paciente, o segundo paciente que se voluntariou para participar deste estudo é um homem adulto que fez uso de implante por vários anos. Mas ao contrário do primeiro, este paciente tem um histórico mais longo com doenças peri-implantares, visto que já perdeu um total de seis implantes por corrosão. Além da peri-implantite, este paciente também sofre com tártaro. As concentrações elementares obtidas para cada região de coleta estão listadas na Tabela 7 e ilustradas na Figura 31. Além disso, a Figura 32 traz um dos espectro obtidos para a amostra de região de peri-implantite desse paciente.

Como no primeiro caso, aqui também é possível notar que as contagens de ferro e enxofre são maiores no sulco peri-implantar acometido pela doença do que nas demais regiões (Figuras 31i e 31d). Dessa forma, é possível atribuir as mesmas causas para esse comportamento: maior presença de macrófagos e efeitos da infecção bacteriana respectivamente. As altas presenças de cloro e zinco (Figuras 31e e 31k) nessa região também são indicativos do combate da doença pelo sistema imunológico.

Figura 31 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A2.



Fonte: elaborado pelo autor.

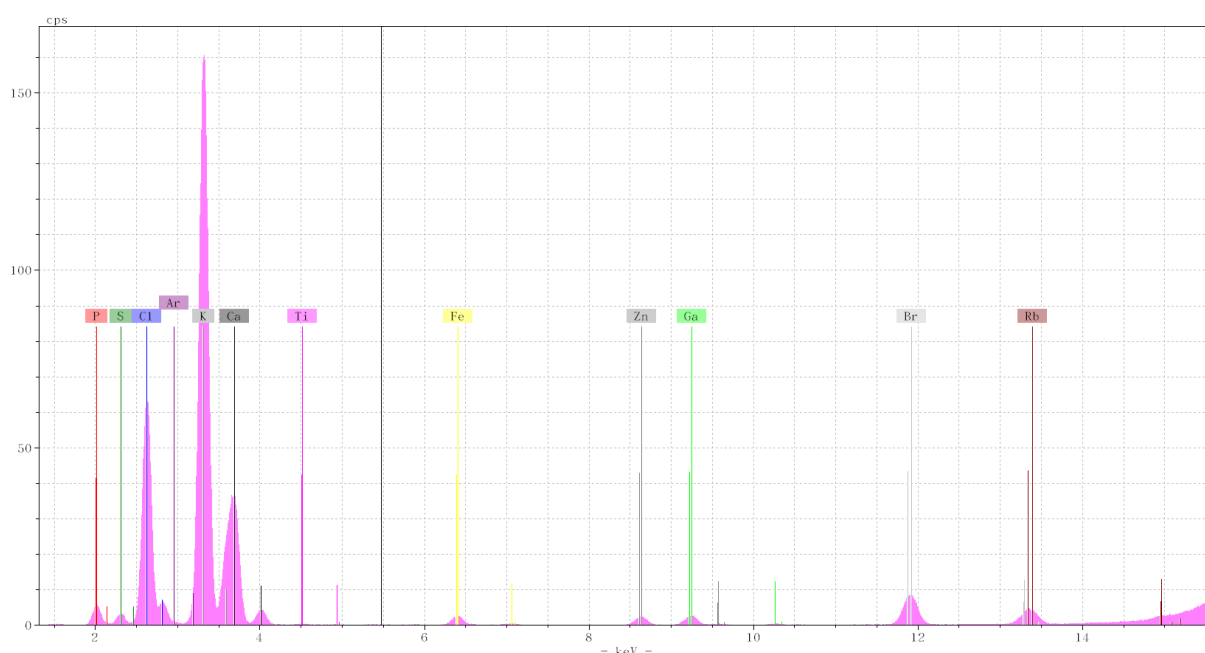
Tabela 7 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A2.

	Parótida		Peri-Implantite		Sulco Saudável		Interior	
Al	1060	±40	—	—	—	—	—	—
Si	200	±20	—	—	420	±25	—	—
P	23800	±160	26380	±170	16840	±140	30920	±120
S	2390	±60	69500	±300	19710	±160	28600	±120
Cl	11210	±120	139800	±400	127500	±400	334800	±400
K	621000	±800	592300	±800	459900	±700	1229200	±700
Ca	48100	±200	107200	±300	124800	±400	321600	±400
Ti	180	±20	400	±30	390	±30	1390	±30
Fe	1130	±30	5800	±80	2830	±50	6620	±50
Co	—	—	—	—	—	—	1130	±20
Zn	3540	±60	42200	±200	16790	±130	28690	±110
Br	40300	±200	37800	±200	39100	±200	109800	±200
Rb	14010	±140	28600	±200	14650	±150	39550	±150

Fonte: elaborado pelo autor.

Além disso, as contagens de cálcio (Figura 31g) para esse paciente são significativamente maiores do que para os demais. Esse comportamento pode ser atribuído à presença do tártaro, uma vez que essa doença é caracterizada pela calcificação de placa bacteriana ao redor dos dentes e gengivas [84].

Figura 32 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A2.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.2.3 Paciente A3

A terceira paciente que concordou em fornecer amostras de saliva para participação deste trabalho é uma mulher adulta que perdeu um implante para a peri-implantite mas possui

outros implantes em bom estado em sua boca. Por apresentar mucosite peri-implantar em um dos sulcos peri-implantares, a coleta dessa região também foi feita para verificar a composição elementar nessa região inicial da doença. Os dados para essa paciente estão listados na Tabela 8 e ilustradas na Figura 33. Além disso, a Figura 34 traz um dos espectro obtidos para a amostra de região de peri-implantite dessa paciente.

Tabela 8 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para a Paciente A3.

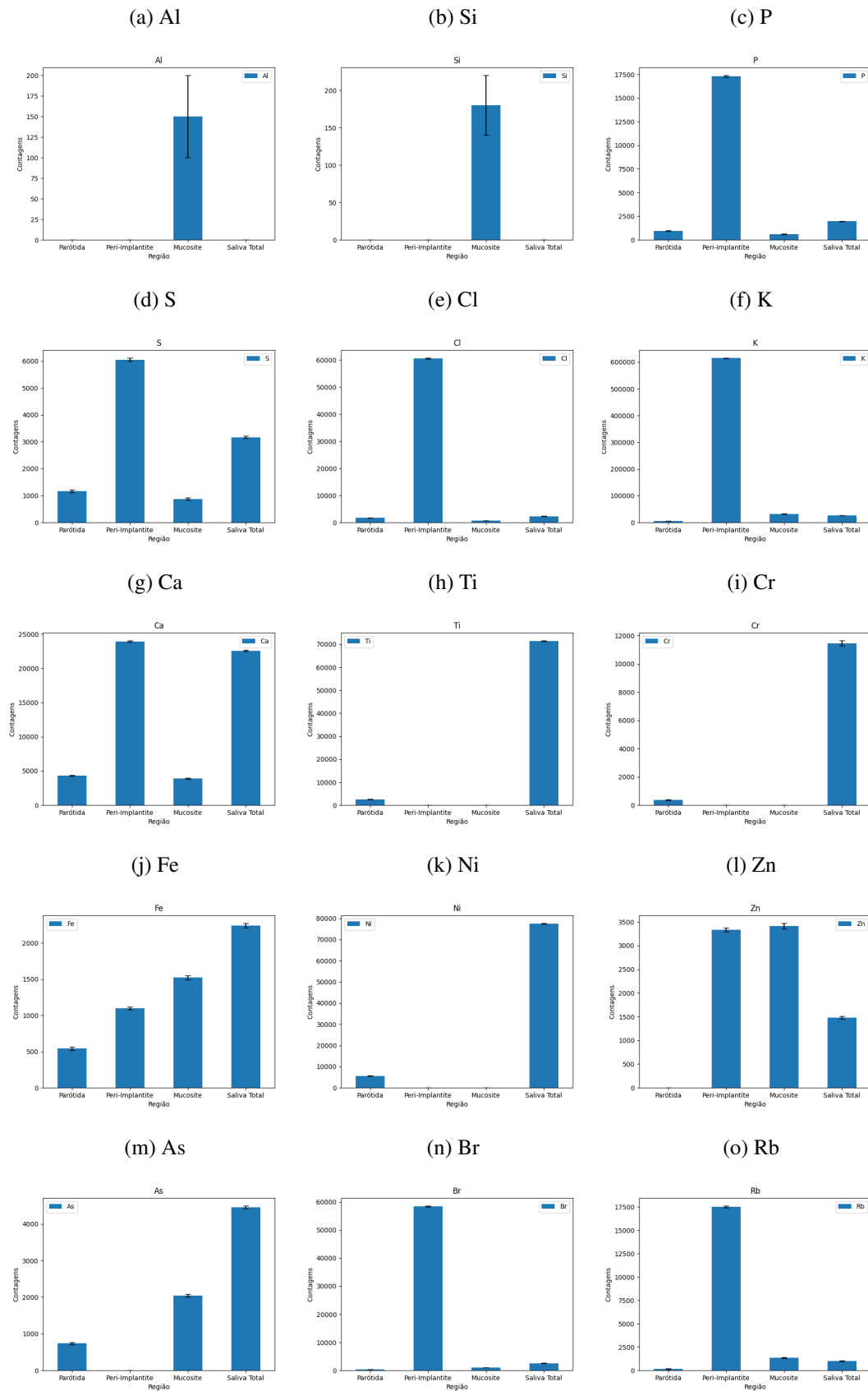
	Parótida	Peri-Implantite	Mucosite	Saliva Total
Al	—	—	140 ±50	—
Si	—	—	180 ±40	—
P	970 ±50	17310 ±90	610 ±50	1970 ±40
S	1160 ±50	6050 ±60	880 ±50	3170 ±50
Cl	1780 ±60	60560 ±170	750 ±50	2330 ±40
K	5580 ±80	614500 ±500	32610 ±180	25890 ±110
Ca	4330 ±70	23930 ±110	3890 ±70	22580 ±100
Ti	2570 ±50	—	—	71400 ±180
V	115 ±10	—	—	—
Cr	370 ±20	—	—	11450 ±70
Fe	540 ±20	1100 ±20	1520 ±30	2240 ±30
Ni	5620 ±70	—	—	77460 ±180
Zn	—	3330 ±40	3410 ±60	1480 ±30
As	740 ±30	—	2040 ±40	4450 ±40
Br	310 ±20	58410 ±160	1010 ±30	2590 ±30
Rb	150 ±60	17500 ±100	1360 ±50	990 ±50

Fonte: elaborado pelo autor.

A Paciente A3 apresentou os dados mais desiguais entre os membros de seu grupo. Enquanto as amostras coletadas dos Paciente A1, A2 e A4 apresentam um comportamento semelhante, o mesmo não pode ser dito desta paciente, como fica evidente nas Figuras 29 a 35, especialmente em função das contagens verificadas para o ferro. Não há contagens de titânio verificadas no sulco com peri-implantite e no sulco com mucosite, ao passo que na saliva total o número é bem elevado. Esse comportamento pode ser atribuído aos demais implantes que a paciente usa, que podem estar liberando partículas na saliva total.

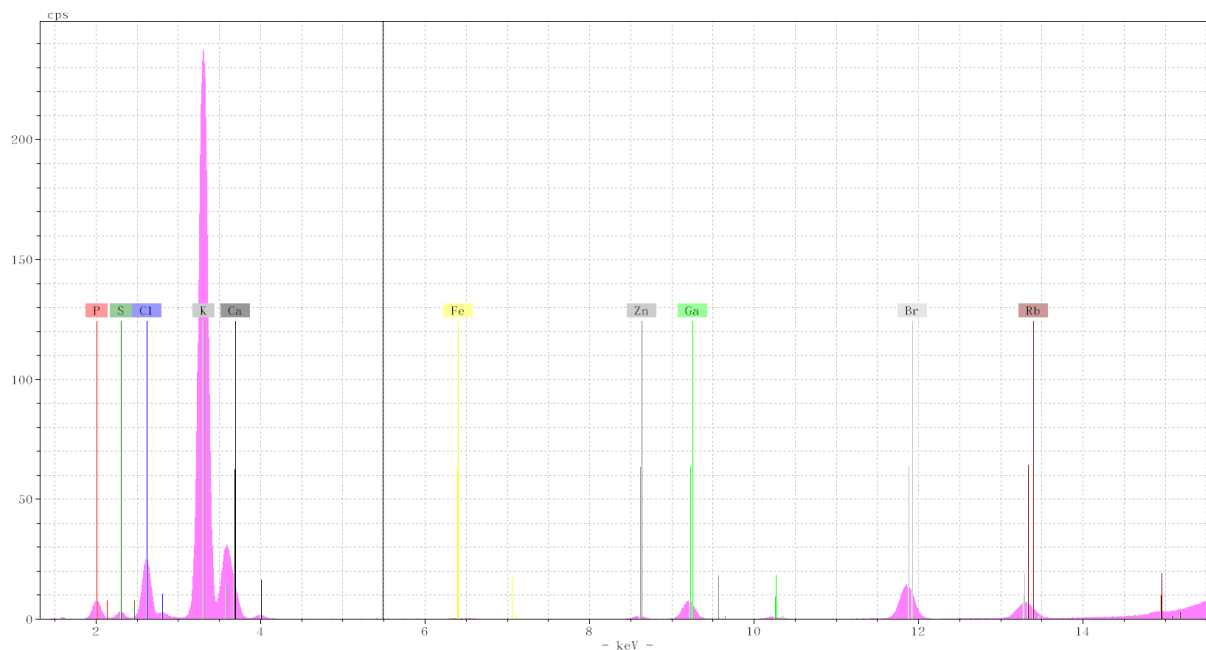
As altas contagens de zinco (Figura 33l) e cloro (Figura 33e) verificadas tanto nas regiões de peri-implantite quanto de mucosite peri-implantar podem estar associadas com o combate da infecção. A maior incidência de enxofre (Figura 33d) na região de peri-implantite também pode ser entendida como um sintoma da infecção bacteriana. O arsênio detectado na saliva (Figura 33m) não está relacionada com a peri-implantite, mas sua presença nas amostras indicam uma possível exposição da paciente ao elemento [85]. Longa exposição a este material por meio de ingestão de alimentos e líquidos pode levar ao desenvolvimentos de lesões e câncer de pele [86].

Figura 33 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 34 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A3.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.2.4 Paciente A4

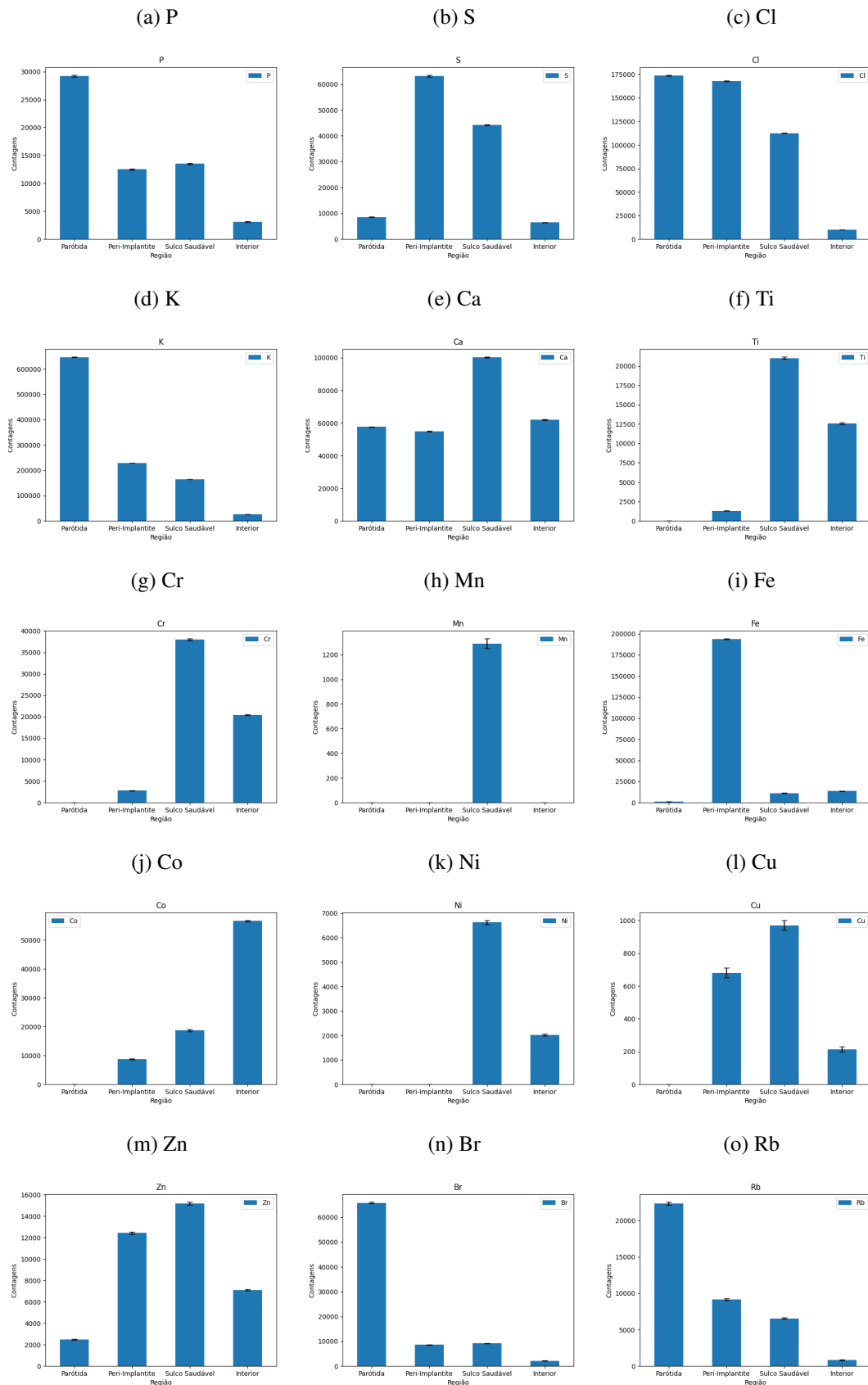
A quarta pessoa a participar deste estudo é um homem adulto que faz uso de implantes dentais há vários anos. As concentrações elementares obtidas para cada região de coleta estão listadas na Tabela 9 e ilustradas na Figura 35. Além disso, a Figura 36 traz um dos espectro obtidos para a amostra de região de peri-implantite desse paciente.

Tabela 9 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente A4.

	Parótida		Peri-Implantite		Sulco Saudável		Interior	
P	29200	±170	12520	±120	13510	±130	3090	±70
S	8600	±110	63200	±300	44200	±200	6480	±90
Cl	173700	±400	167900	±400	112600	±300	10090	±110
K	646900	±800	228400	±500	164400	±400	26370	±170
Ca	57600 ±	±250	54900	±200	100200	±300	62100	±300
Ti	—		1300	±40	21020	±150	12580	±110
Cr	—		2800	±50	37990	±190	20420	±140
Mn	—		—		1290	±40	—	
Fe	1110	±30	193700	±400	11370	±100	13680	±120
Co	—		8740	±90	18700	±400	56600	±200
Ni	—		—		6630	±80	2020	±40
Cu	—		680	±30	970	±30	215	±15
Zn	2490	±50	12420	±110	15180	±120	7110	±80
Br	65800	±300	8650	±100	9190	±100	2170	±50
Rb	22350	±170	9150	±130	6570	±120	860	±80

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 35 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente A4.



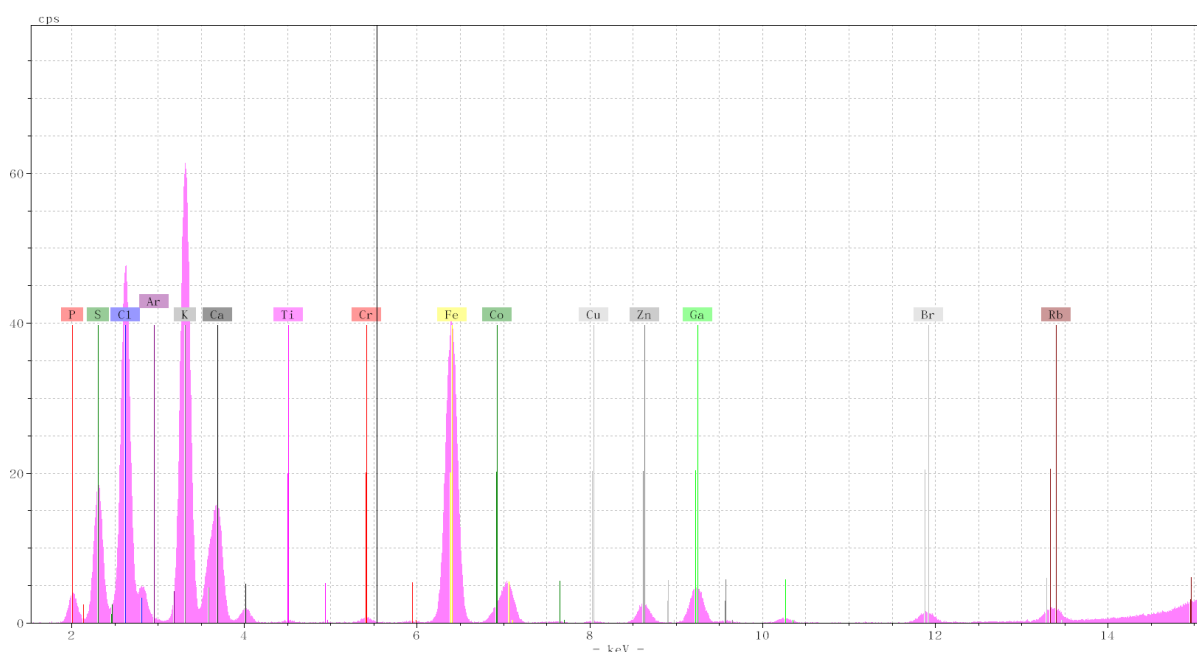
Fonte: elaborado pelo autor.

Repetindo os comportamentos verificados nos Paciente A1 e A2, o Paciente A4 apresenta as maiores contagens de ferro e enxofre (Figuras 35i e 35b) no sulco acometido pela doença, reforçando a suposição de que estes elementos são decorrentes da presença de macrófagos na saliva e uma evidência da ação bacteriana, respectivamente.

Na coleta da glândula parótida, é possível verificar um valor relativamente alto para contagens de bromo (Figura 35n). Por se tratar da parótida, esse fenômeno é decorrente da dieta do paciente ou efeito de alguma medicação, por ser um elemento comumente encontrado em xaropes [87].

Outra situação verificada para este paciente é a alta presença de cromo (Figura 35g) tanto nas regiões de coleta de um sulco peri-implantar saudável quanto no interior do implante retirado, além da presença de níquel (Figura 35k). A presença destes dois elementos, junto ao titânio, sugere que os implantes utilizados por este paciente não são de titânio comercialmente puro, mas sim uma liga metálica de NiCr com titânio.

Figura 36 – Espectro obtido para a amostra de sulco com peri-implantite do Paciente A4.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com os resultados verificados nas análises deste grupo foi possível verificar que o elemento titânio não está relacionado com a peri-implantite, uma vez que nenhum comportamento para as regiões de coleta de sulcos doentes foi discernível dentre os resultados obtidos. Em contrapartida, os elementos ferro e enxofre nas amostras de saliva aparentam estar relacionadas com a ação da doença e, em menor grau, zinco e cloro. Outro elemento que apresentou contagens significativas é o potássio, mas pouco pode ser dito sobre esse elemento como marcador pois está presente em todas as células do corpo humano, já que desempenha um papel importante na troca de nutrientes entre células. Os elementos fósforo e cálcio também são abundantes em

todas as amostras, isso se dá ao fato de que a homeostase entre esses elementos é fundamental para a remineralização dos dentes [88].

6.3 Grupo B

Nessa seção serão avaliados e discutidos os resultados obtidos para os pacientes que fazem parte do Grupo 2, isto é, aqueles cujas amostras de saliva foram coletadas em diferentes regiões de um implante que foi perdido para a peri-implantite e removido da boca do paciente, com o intuito de avaliar a presença dos elementos nessas regiões e, relacionando-as com os resultados obtidos para o Grupo 1, estimar em qual região do implante a ação da doença foi mais aguda. A presença de cada elemento será justificada com base em dados estudados na literatura, quando possível. Para este grupo o objetivo é comparar a composição elementar das diferentes regiões de um implante entre si.

6.3.1 Paciente B1

O quinto paciente a participar deste estudo é um homem adulto que faz uso de implantes há cerca de cinco anos e apresenta uma boa saúde bucal. As contagens obtidas para cada região de coleta estão listadas na Tabela 10 e ilustradas na Figura 37. Além disso, a Figura 38 traz um dos espectro obtidos para a amostra coletada do corpo do implante perdido por esse paciente.

Tabela 10 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B1.

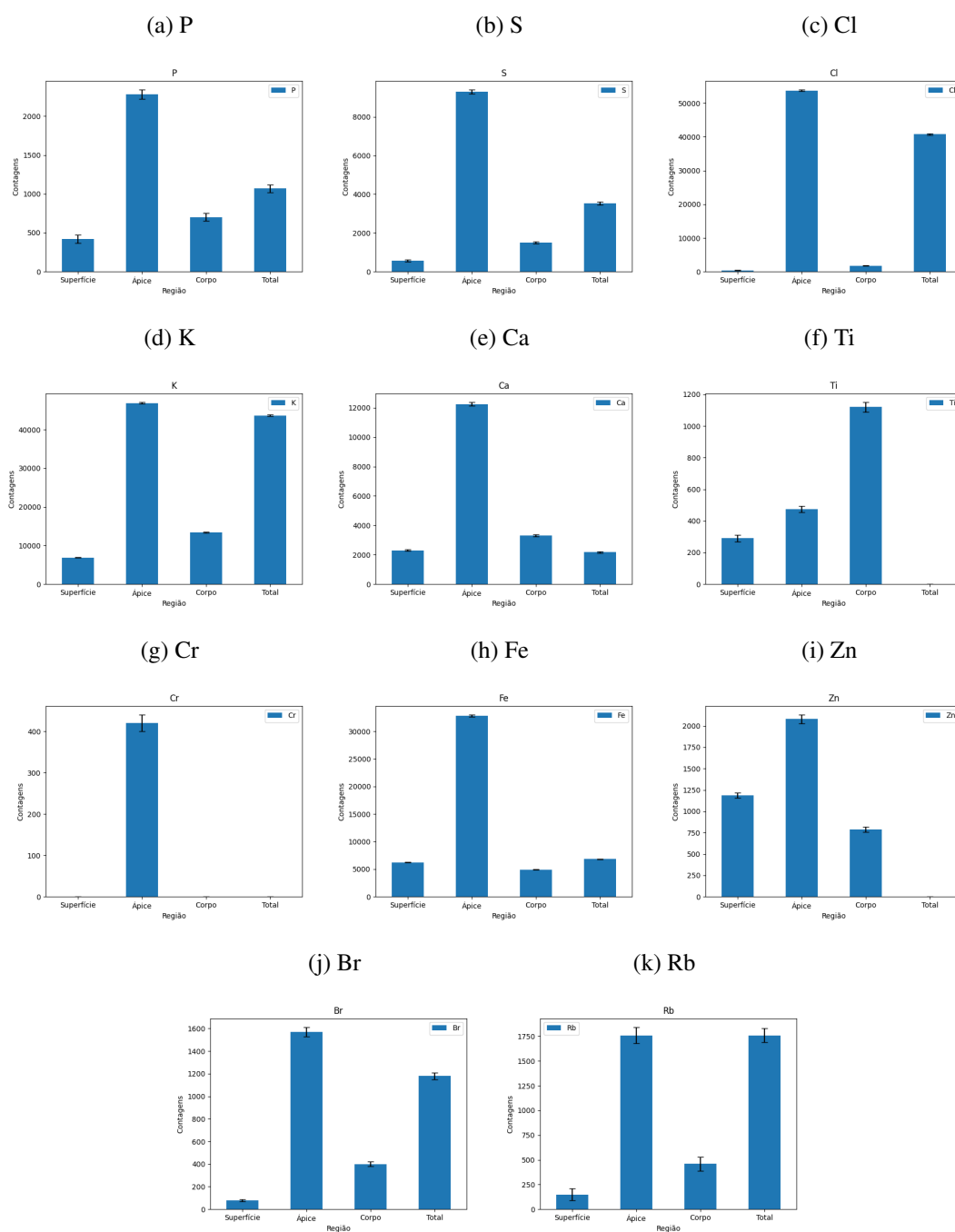
	Superfície		Ápice		Corpo		Total	
P	420	±50	2280	±60	700	±50	1070	±50
S	560	±50	9290	±110	1500	±60	3530	±70
Cl	390	±40	53800	±200	1740	±60	40800	±200
K	6880	±90	46900	±200	13370	±120	43700	±200
Ca	2300	±50	12250	±120	3310	±60	2170	±50
Ti	290	±20	475	±20	1120	±30	—	
Cr	—		420	±20	—		—	
Fe	6240	±80	32800	±180	4930	±70	6820	±80
Zn	1190	±30	2080	±50	790	±30	—	
Br	80	±10	1570	±40	400	±20	1180	±30
Rb	150	±60	1760	±80	460	±70	1760	±70

Fonte: elaborado pelo autor.

O implante deste paciente foi mal posicionado ao ser implantado, o que facilitou o desenvolvimento da peri-implantite. O espaço vazio formado entre a peça intermediária e o implante é propício para a deposição de restos de alimentos e saliva, o que facilita o desenvolvimento de bactérias nessa região.

A amostra de saliva dita como "total" para os implantes corresponde a uma mistura das demais regiões coletas. Com os resultados obtidos na Seção 6.2 foi possível relacionar a

Figura 37 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B1.

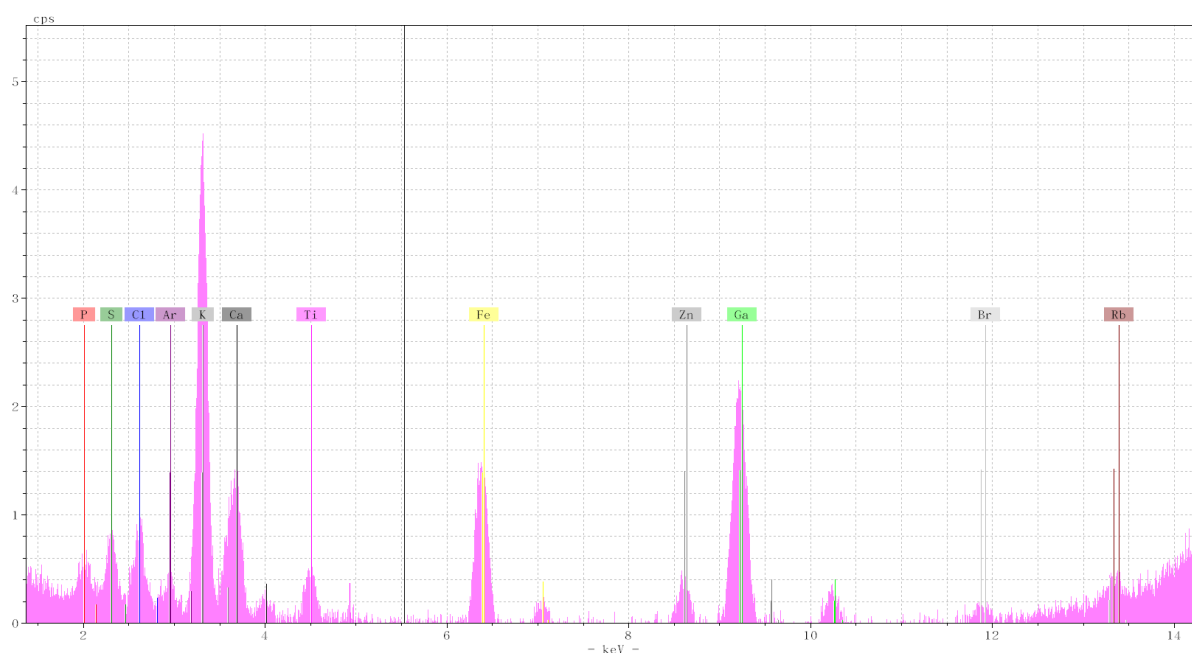


Fonte: elaborado pelo autor.

peri-implantite com a presença dos elementos enxofre, cloro ferro e zinco. No paciente B1, as maiores contagens para esses quatro elementos foram verificadas na região do ápice do implante (Figuras 37b, 37c, 37h e 37i). Dessa forma, é possível assumir que a ação da peri-implantite sobre este implante foi mais aguda em seu ápice. Tal comportamento pode ser explicado pelo fenômeno que levou a troca do implante, o mal posicionamento do mesmo. Com o acúmulo de material biológico nessa área é natural que ela se torne mais propensa ao crescimento de bactérias.

A maior presença de titânio (Figura 37f) na coleta do meio do corpo do implante indica que nessa região ocorre a maior liberação de partículas do implante. É possível que isso indique uma ruptura na camada de óxido de titânio causando maior liberação de íons nessa área. É possível que essa ruptura tenha ocorrido quando o implante foi colocado na boca do paciente, uma vez que essa região é aquela que é parafusada à mandíbula.

Figura 38 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B1.



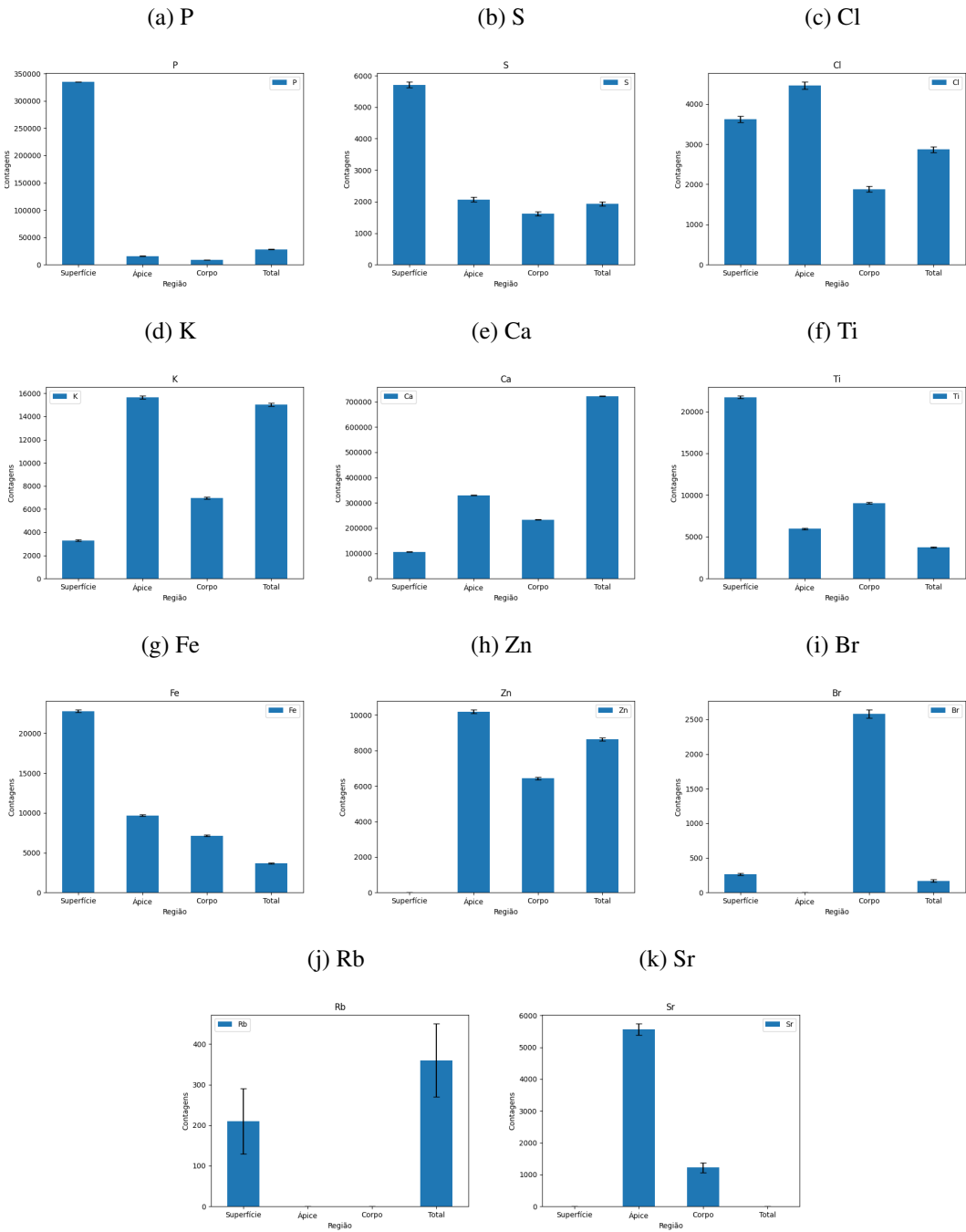
Fonte: elaborado pelo autor.

6.3.2 Paciente B2

A sexta paciente é uma mulher adulta que fez uso de implante por alguns anos antes de sofrer perdas pela peri-implantite. Um dos implantes se soltou por corroer a estrutura óssea onde estava afixado, e além disso os demais implantes da paciente tiveram que ser trocados por estarem mal posicionados, tornando-os propensos ao desenvolvimento facilitado de doenças. Além disso, parte da resina que protege a superfície dos implantes havia sido desgastada, facilitando a corrosão. As amostras coletadas são referentes ao implante que foi perdido para a doença, e os dados de contagens medidos estão dispostos na Tabela 11 e ilustrados na Figura 39. Além disso, a Figura 40 traz um dos espectro obtidos para a amostra coletada do corpo do implante perdido por essa paciente.

As contagens de enxofre e ferro são maiores na superfície do implante do que nas demais regiões (Figuras 39b e 39g), indicando que ação da peri-implantite foi mais acentuada nessa região do implante. Essa região é aquela que esta em contato direto com a prótese e fica visível sobre a gengiva. O fato de que prótese também tem um suporte de titânio em seu interior que é parafusado sobre a peça intermediária do implante pode trazer uma explicação para a maior presença de titânio nessa mesma região (Figura 39f).

Figura 39 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B2.



Fonte: elaborado pelo autor.

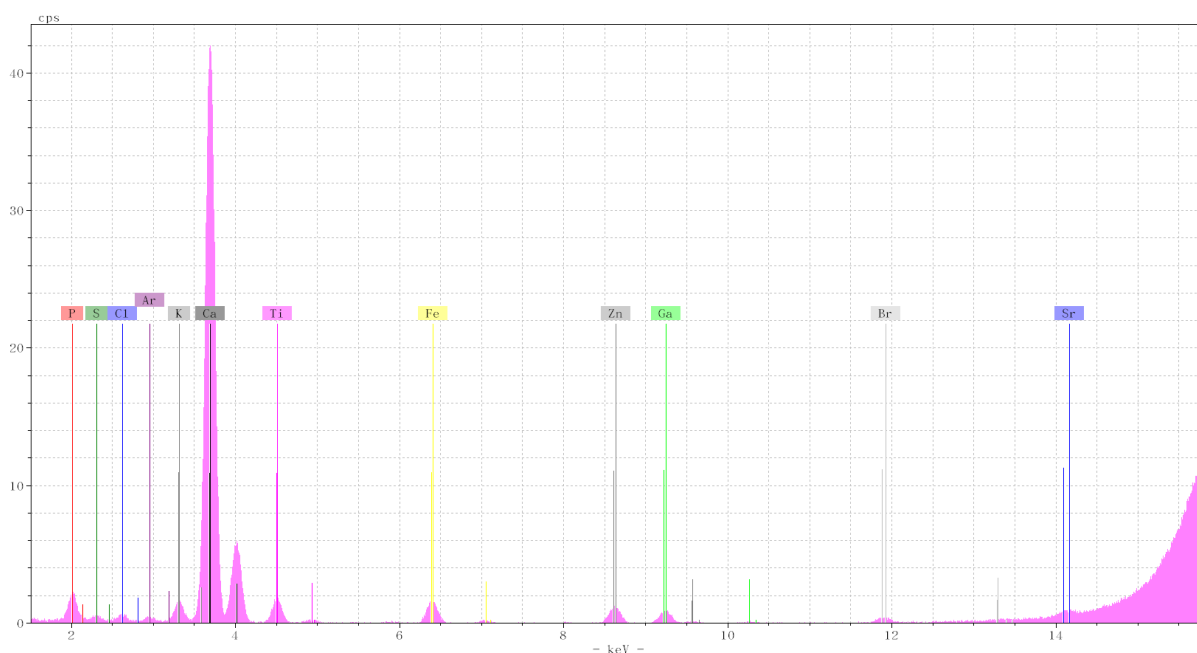
Tabela 11 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B2.

	Superfície		Ápice		Corpo		Total	
P	334800	±80	15750	±140	9110	±110	28240	±170
S	5710	±90	2070	±70	1620	±60	1930	±60
Cl	3620	±80	4460	±90	1880	±70	2870	±70
K	3290	±70	15640	±140	6960	±100	15030	±140
Ca	106100	±300	329900	±600	233600	±500	722700	±900
Ti	21740	±150	5960	±80	9040	±90	3730	±60
Fe	22800	±150	9680	±100	7140	±80	3650	±60
Zn	—		10200	±100	6430	±80	8630	±90
Br	265	±15	—		2580	±60	170	±20
Rb	210	±80	—		—		360	±90
Sr	—		5560	±180	1220	±160	—	

Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de não estar relacionado com a peri-implantite, o estrôncio (Figura 39k) encontrado em amostras de saliva serve como marcador de algumas doenças como cáries [89] e complicações associadas à diabetes [90].

Figura 40 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B2.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.3.3 Paciente B3

A sétima paciente a participar deste estudo é uma mulher adulta que, ao contrário dos demais pacientes estudados, não faz uso de implante metálico mas sim de implante de zircônia, por ser portadora de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Essa doença é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios motores localizados no cérebro e na medula espinhal,

resultando em fraqueza muscular e paralisia [91]. A doença é incurável, mas o tratamento dos sintomas pode ser feito com o uso de imunossupressores [92], que é o caso dessa paciente.

Optou-se por utilizar implante de óxido de zircônio nessa paciente com o intuito de evitar possíveis infecções de interações indesejadas que pudessem agravar o quadro da doença. O implante dessa paciente foi retirado pois havia sido perdido mas não havia sinais de peri-implantite, portanto não há motivo aparente para essa perda. Por conta disso, as coletas dessa paciente foram feitas em diferentes regiões do implante retirado ao invés de diferentes regiões da boca.

Para verificar a degradação do implante sofrida por decorrência da doença, nesse caso optou-se buscar a presença de Zr nos espectros obtidos. Tal detecção não foi possível pelas linhas K, uma vez que a emissão $K\alpha$ do Zr é muito próxima à do Mo, que é o material do qual o tubo de raios X da fonte é formado¹. Dessa forma, a detecção para esse elemento precisou ser feita considerando as linhas $L\alpha$ de missão.

Os dados de contagens medidos estão dispostos na Tabela 12 e ilustrados na Figura 41. A amostra "Corpo*" foi coletada no meio do corpo do implante e apresentou certa contaminação de sangue. Além disso, a Figura 42 traz um dos espectro obtidos para a amostra coletada do ápice do implante perdido por essa paciente.

Tabela 12 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente B3.

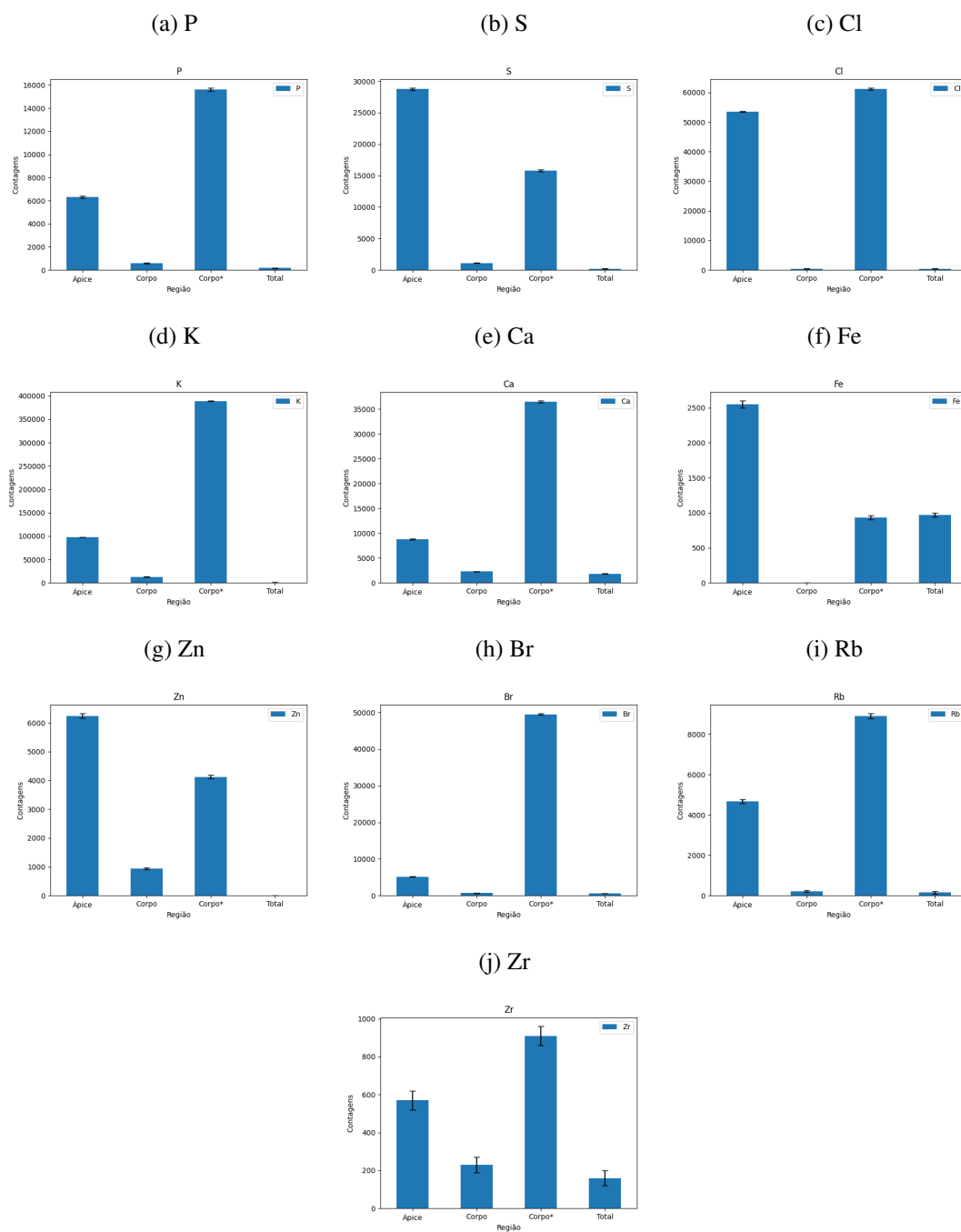
	Ápice		Meio		Meio*		Total	
P	6330	±90	590	±50	15610	±130	170	±40
S	28740	±180	1120	±50	15790	±140	190	±40
Cl	53500	±200	450	±40	61200	±300	450	±40
K	97400	±300	12850	±120	389000	±600	760	±40
Ca	8730	±100	2260	±50	36450	±200	1820	±50
Fe	2550	±50	—	—	930	±30	970	±30
Zn	6240	±80	940	±30	4120	±60	—	—
Br	5170	±70	680	±30	49500	±200	610	±30
Rb	4670	±100	210	±60	8900	±120	150	±60
Zr	570	±50	230	±40	910	±50	160	±40

Fonte: elaborado pelo autor.

As contagens de zircônio (Figura 41j) são maiores na região corpo do implante contaminada com sangue, o que sugere que, assim como nos implantes de titânio, a região onde o implante é parafusado é mais suscetível à liberação de partículas. Além disso, o ápice do implante apresentou as maiores contagens de enxofre, cloro e ferro (Figuras 41b, 41c e 41f), o que indica uma possível infecção nessa região. A amostra contaminada com sangue apresentou uma contagem de bromo (Figura 41h) muito mais alta do que nas demais regiões, mas esse comportamento pode ser atribuído a remédios ingeridos pela paciente, uma vez que este elemento é encontrado em alguns remédios (como discutido nos resultados verificados para o Paciente B1).

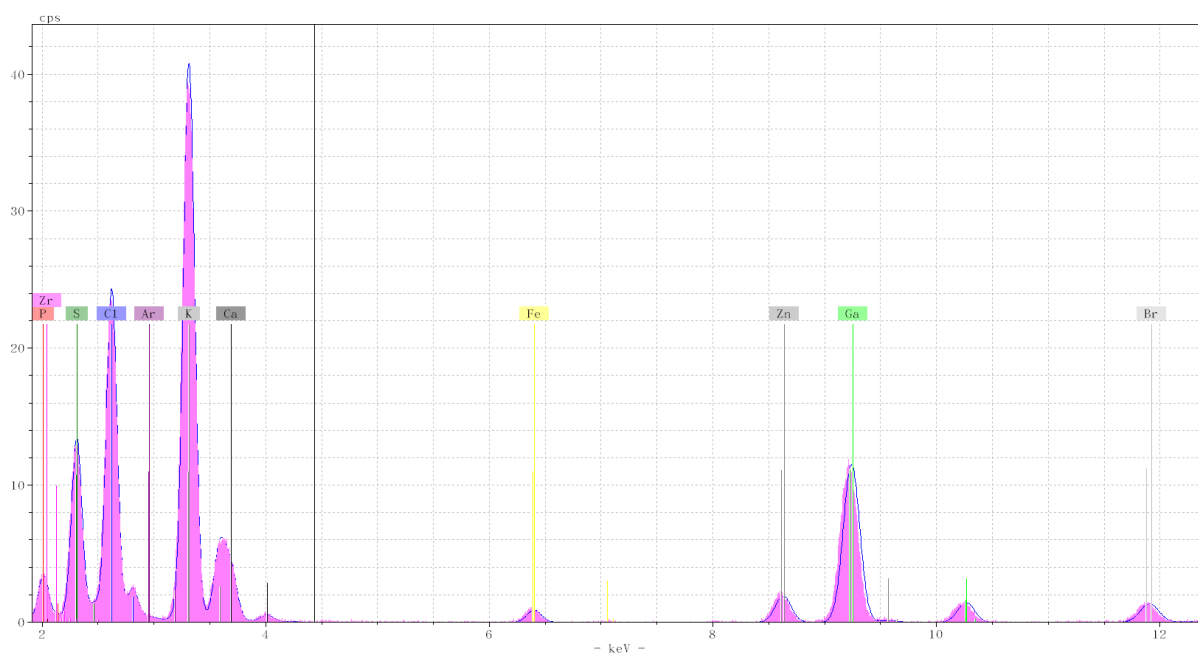
¹ $K\alpha_{Mo} = 17.480 \text{ keV}$; $K\alpha_{Zr} = 15.775 \text{ keV}$

Figura 41 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente B3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 42 – Espectro obtido para a amostra do corpo do implante do Paciente B3.



Fonte: elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos pelos pacientes do Grupo A é possível inferir em quais das regiões dos implantes perdido pelos pacientes do Grupo B houve infecção mais aguda. Para os pacientes B1 e B3 há indícios de que a ação bacteriana se mostrou mais intensa no ápice dos implantes, isto é, na região inferior em contato direto com a mandíbula. Para o paciente B2, entretanto, as contagens de enxofre e ferro foram maiores na superfície do implante, isto é, na região de contato com a prótese aplicada.

6.4 Grupo C

Nessa seção serão avaliados e discutidos os resultados obtidos para os pacientes que fazem parte do Grupo 3, isto é, aqueles cujas amostras de saliva foram coletadas de modo mais heterogêneo em relação aos outros dois grupos. Neste grupo foram incluídas amostras de tecido gengival para confirmar a suposição feita ao longo da discussão da Seção 6.2, de que o titânio corroído pelos implantes é depositado na gengiva ao invés de ficar em suspensão na saliva, baseadas nos dados do trabalho de Soler e colaboradores [5]. Para este grupo o objetivo é comparar a composição elementar das amostras de tecido gengival com as demais para cada paciente.

6.4.1 Paciente C1

A Paciente C1 é uma mulher adulta que apresenta uma boa saúde bucal e fez uso de implantes por vários anos antes do momento da coleta. Os dados de contagens medidos estão dispostos na Tabela 13 e ilustrados na Figura 43. Além disso, a Figura 44 traz um dos espectro

Tabela 13 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C1.

	Peri-Implantite		Saliva Total		Sulco Dente		Gengiva	
Al	150	±50	200	±50	150	±50	120	±50
Si	160	±40	140	±40	150	±40	—	
P	2410	±70	4200	±80	7190	±90	1520	±60
S	6320	±90	1640	±60	3250	±70	5830	±90
Cl	5180	±90	220	±40	4540	±80	11230	±110
K	13370	±120	98500	±300	125100	±400	21870	±150
Ca	112600	±300	6800	±90	28000	±170	10460	±100
Ti	8230	±100	—		330	±20	16870	±130
V	590	±40	—		2900	±50	—	
Cr	970	±40	—		610	±20	—	
Fe	20490	±140	9030	±90	1480	±40	61370	±240
Ni	20250	±140	—		18120	±130	1140	±30
Cu	1070	±40	—		400	±20	—	
Zn	137300	±400	880	±30	5630	±70	3680	±60
Br	990	±30	9280	±100	2500	±50	680	±30
Rb	330	±70	2360	±80	2850	±90	1290	±80
Ba	8990	±100	—		—		—	

Fonte: elaborado pelo autor.

obtidos para a amostra de tecido gengival coletada ao redor da região de peri-implantite dessa paciente.

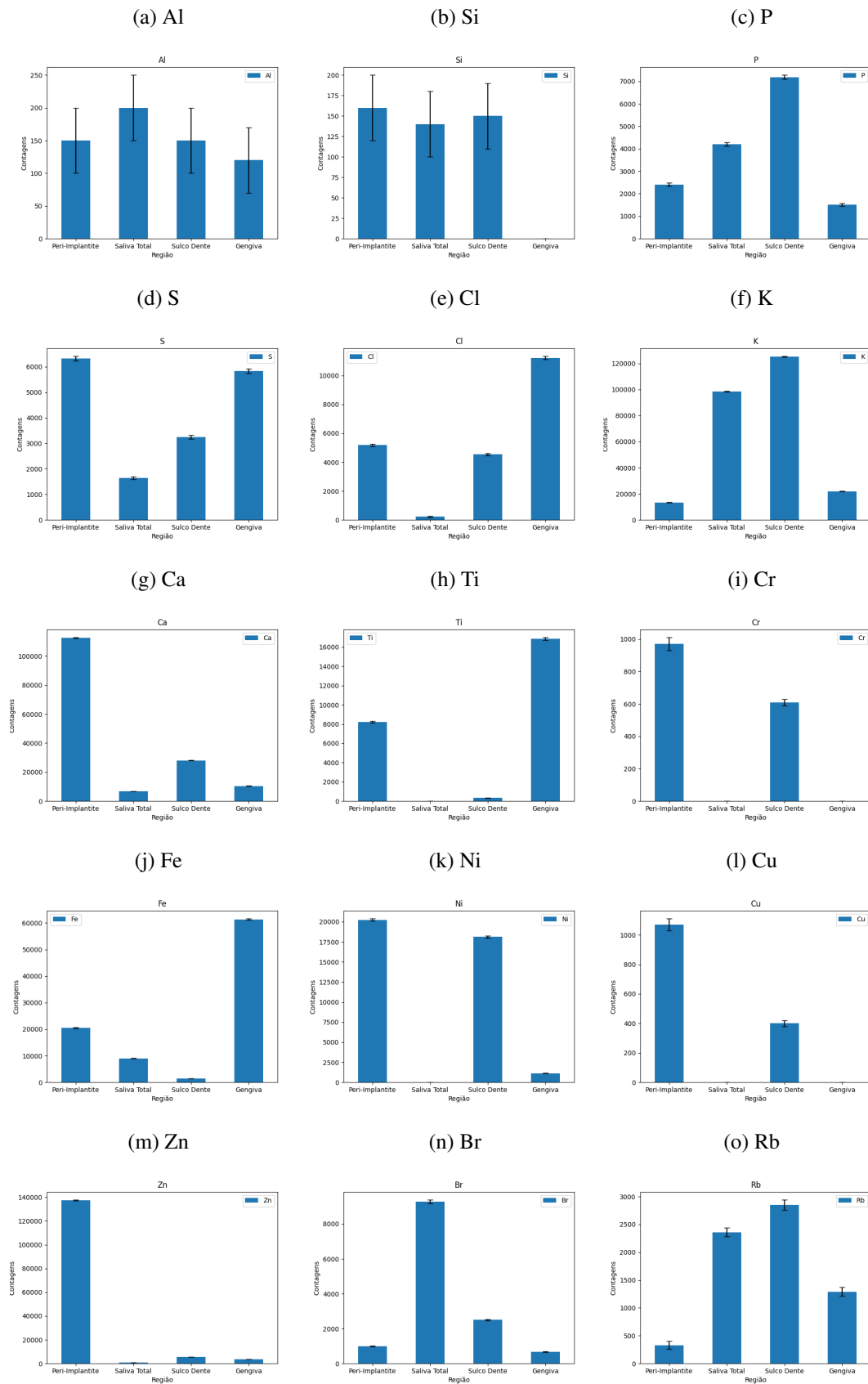
Como visto nos pacientes do Grupo A, as contagens de cloro, enxofre, ferro e zinco no sulco acometido por peri-implantite (Figuras 37b, 37c, 37h e 37i) são maiores do que nas demais regiões de saliva. Tal comportamento corrobora a hipótese de que esses elementos servem de marcadores para a doença.

A amostra de tecido gengival apresenta contagens de titânio muito maiores do que nas demais regiões (Figura 43h), indicando absorção do metal pela gengiva e reforçando os resultados verificados por Soler e colaboradores [5]. Além disso, as contagens ferro (Figura 43j) também são bem maiores no tecido gengival do que na saliva. Tal comportamento pode ser explicado pela presença de sangue ao realizar a raspagem da gengiva.

Este paciente também apresentou vanádio, níquel, cromo, cobre e bário em algumas das amostras. Os quatro primeiros metais não são tóxicos e podem aparecer devido a alguma impureza na confecção do implante. O bário, em contrapartida, é um elemento tóxico que o paciente pode ter ingerido de alguma forma.

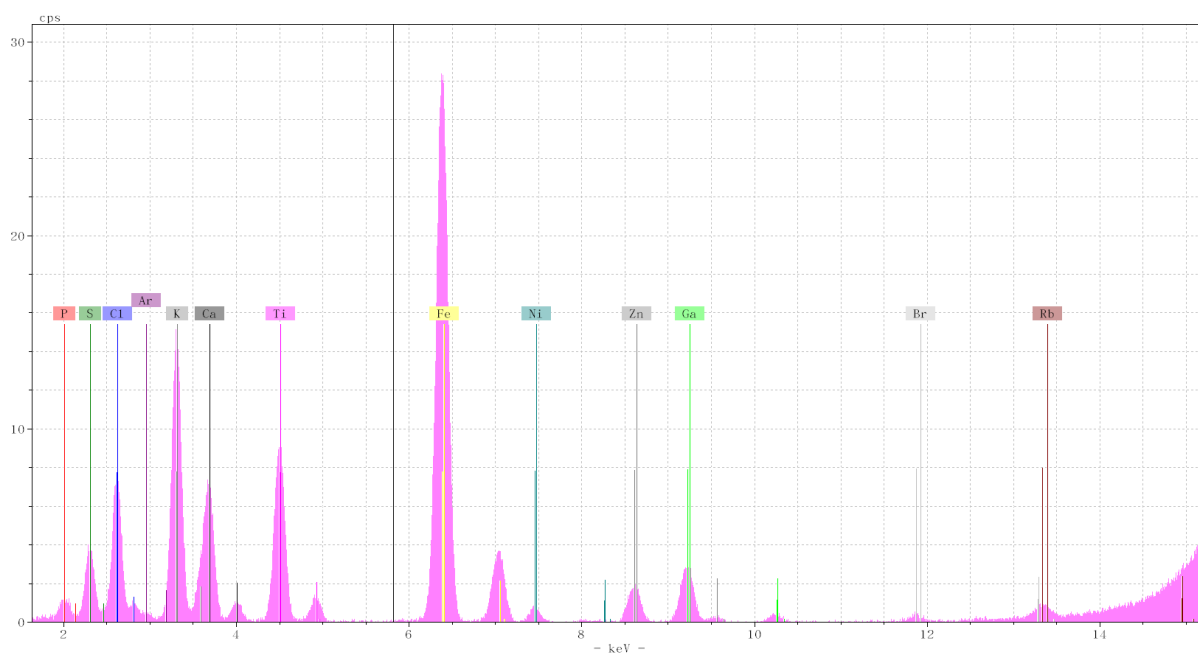
A presença de silício nas três amostras de saliva pode ser explicado pela higiene bucal da paciente, uma vez que o óxido de silício hidratado pode ser encontrado em vários tipos de cremes dentais, agindo como um abrasivo para auxiliar na remoção de partículas, placas e manchas dos dentes [93].

Figura 43 – Contagens medidas para os elementos detectados na Paciente C1.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 44 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado da Paciente C1.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.4.2 Paciente C2

O Paciente C2 é um homem adulto que fez uso de implantes por vários anos antes do momento da coleta e não apresenta maiores problemas de higiene bucal. Os dados de contagens medidos estão dispostos na Tabela 14 e ilustrados na Figura 45. Além disso, a Figura 46 traz um dos espectro obtidos para a amostra de tecido gengival coletada ao redor da região de peri-implantite dessa paciente.

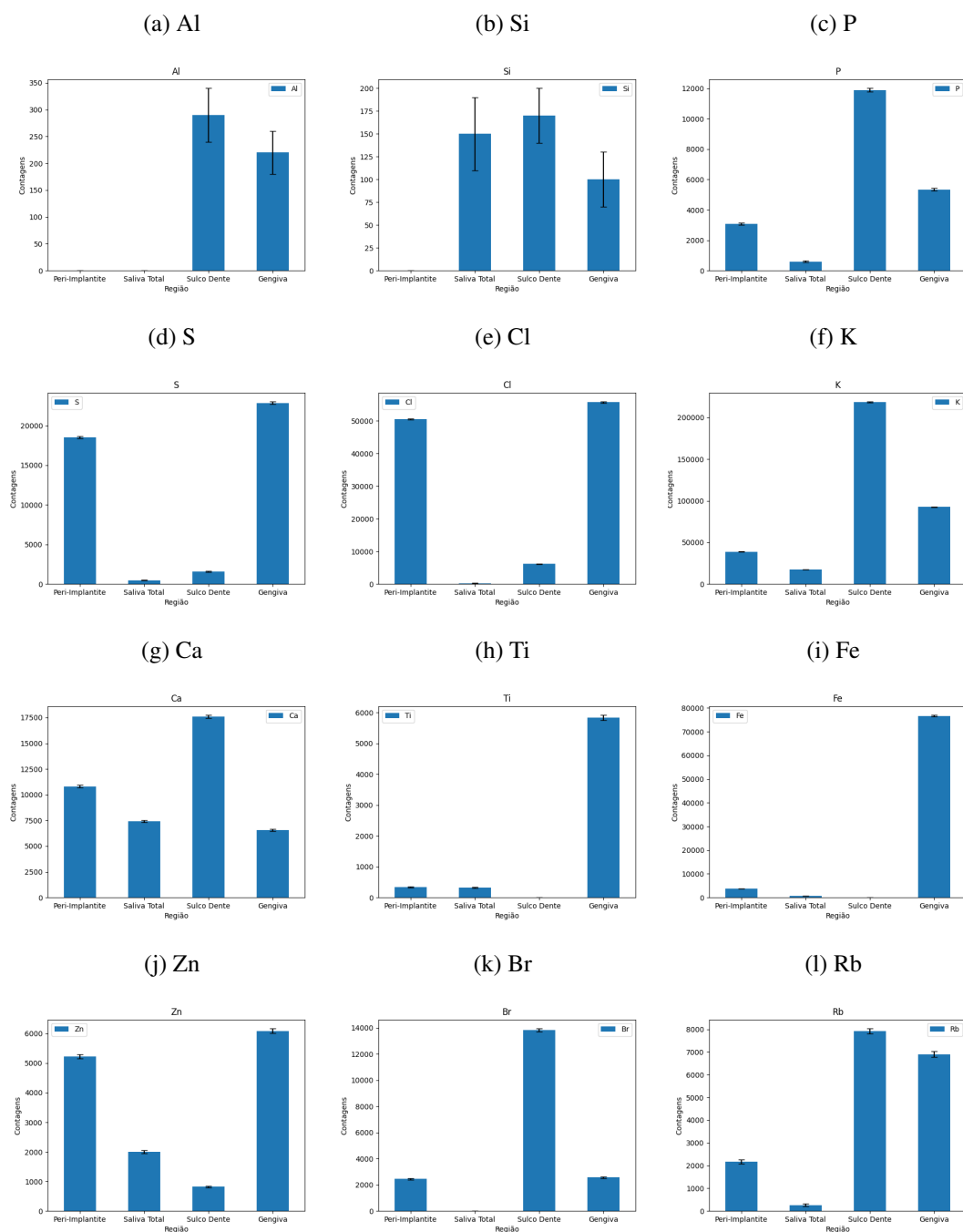
Tabela 14 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C2.

	Peri-Implantite		Saliva Total		Sulco Dente		Gengiva	
Al	—		—		290	±50	220	±40
Si	—		150	±40	170	±30	100	±30
P	3080	±71	600	±50	11900	±120	5350	±90
S	18520	±150	490	±40	1590	±60	22870	±160
Cl	50500	±200	240	±40	6210	±90	55700	±200
K	38900	±200	17440	±140	218600	±500	92600	±300
Ca	10820	±110	7420	±90	17600	±140	6560	±90
Ti	340	±20	320	±20	—		5840	±80
Fe	3810	±60	710	±30	—		76700	±300
Zn	5230	±70	2000	±50	820	±30	6090	±80
Br	2450	±50	—		13830	±120	2570	±60
Rb	2180	±90	260	±60	7920	±110	6900	±120

Fonte: elaborado pelo autor.

Seguindo o padrão verificado pelos Pacientes A1, A2, A4 e C1, a coleta oriunda da região de peri-implantite deste paciente apresenta maiores contagens de enxofre, ferro e cloro

Figura 45 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente C2.

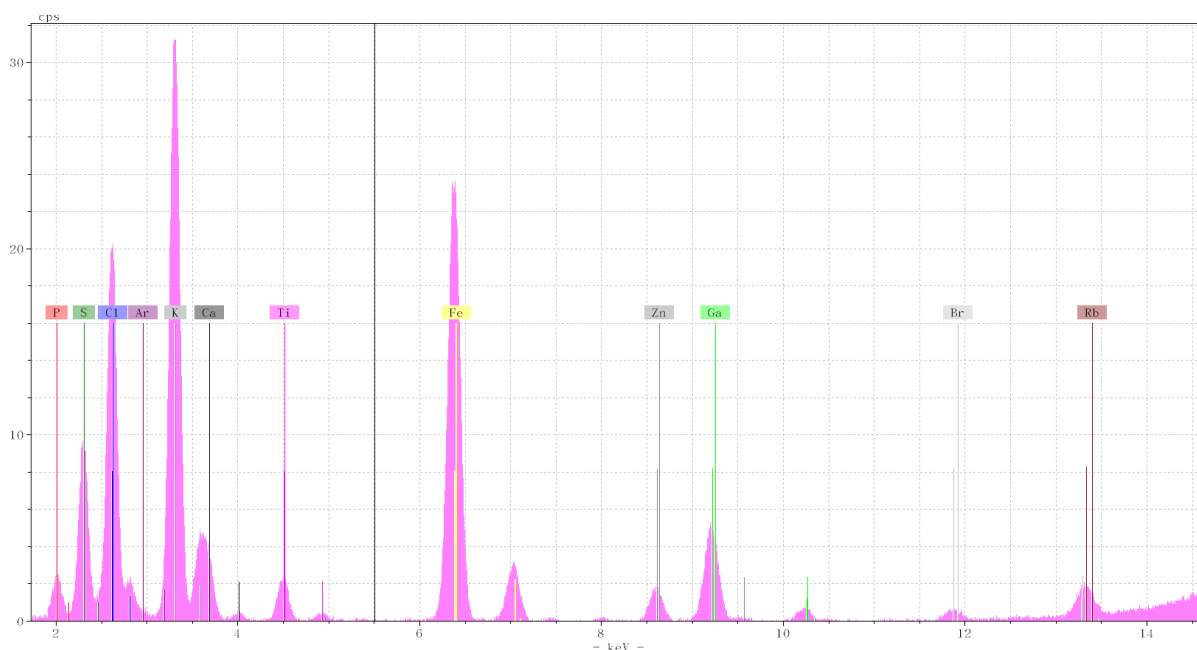


Fonte: elaborado pelo autor.

(Figuras 45d, 45i e 45e) do que as demais regiões de coleta de saliva. Dessa forma, é possível inferir as mesmas explicações para a presença desses elementos.

Assim como na Paciente C1, o Paciente C2 apresenta contagens de titânio (Figura 45h) muito mais elevadas na amostra de tecido gengival do que nas demais. Isso reforça ainda mais a tese de que o titânio corroído do implante é absorvido pela gengiva. As contagens para o ferro (Figura 45i) também são muito mais altas nessa região, o que é explicado pela presença de sangue na amostra de tecido.

Figura 46 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado do Paciente C2.



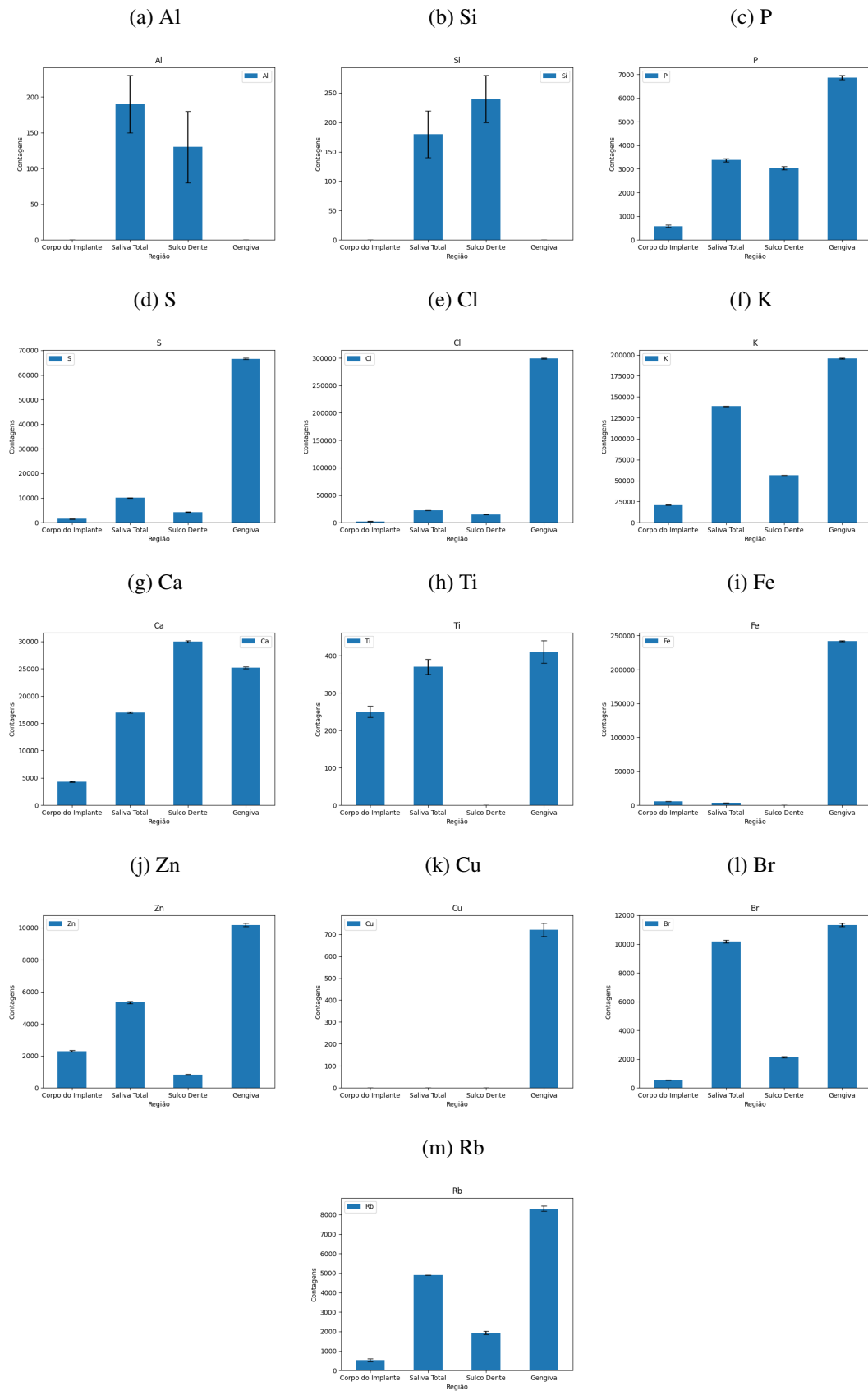
Fonte: elaborado pelo autor.

6.4.3 Paciente C3

O Paciente C3 é um homem adulto que apresenta implantes saudáveis na boca, apesar de ter perdido para a peri-implantite. Para este paciente, uma das coletas foi feita sobre o corpo do implante perdido e os dados de contagens medidos estão dispostos na Tabela 15 e ilustrados na Figura 47. Além disso, a Figura 46 traz um dos espectro obtidos para a amostra de tecido gengival coletada ao redor da região de onde o implante desse paciente foi perdido.

Apesar de as contagens de titânio medidas para as quatro amostras não sofrerem muita variação, a concentração medida na amostra de tecido gengival ainda é ligeiramente maior do que as demais em ordem superior à do σ medido (Figura 47h). Dessa forma, apesar de a presença ser baixa ainda é possível verificar que há absorção de titânio pela gengiva. Além disso, como há apenas uma coleta referente ao corpo do implante não é possível estimar em que região do mesmo a infecção estava mais acentuada, entretanto a presença relativamente alta de enxofre e cloro (Figuras 47d e 47e) nessa amostra em comparação com as amostras de saliva total e do sulco de um dente são indicativos da presença da doença.

Figura 47 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente C2.



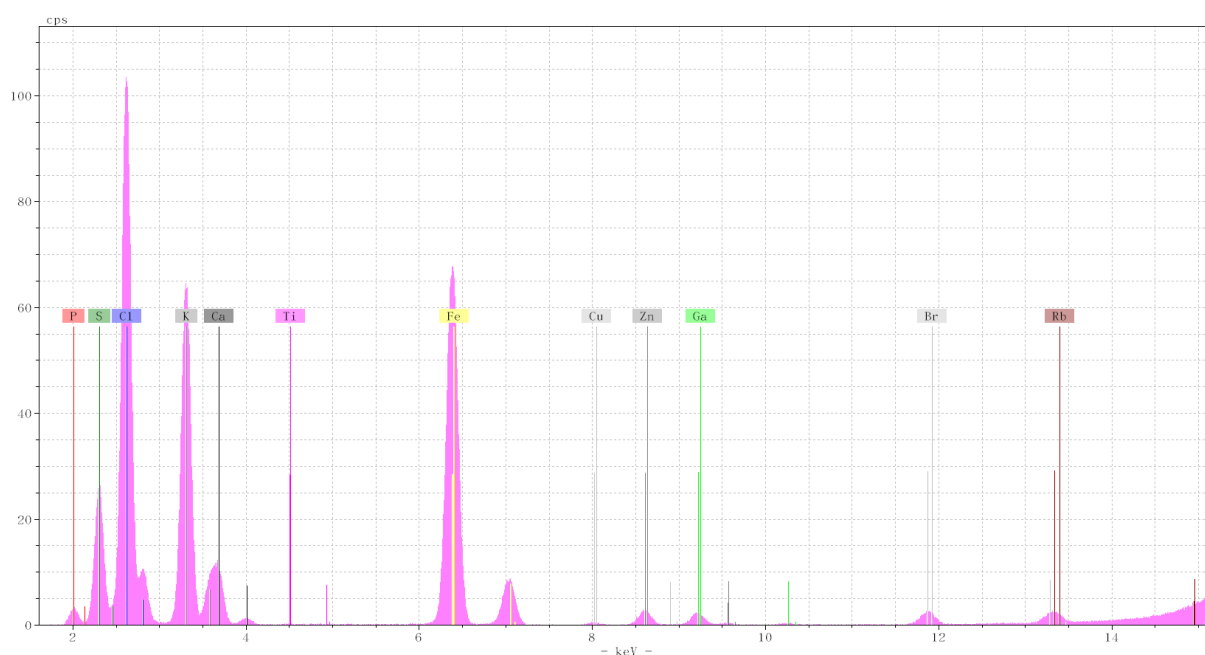
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 15 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente C3.

	Corpo do Implante		Saliva Total		Sulco Dente		Gengiva	
Al	—		190	±40	130	±50	—	
Si	—		180	±40	240	±40	—	
P	580	±50	3380	±70	3030	±70	6870	±90
S	1470	±60	10050	±110	4290	±80	66600	±300
Cl	2260	±60	22200	±160	15000	±130	299300	±600
K	20940	±150	138800	±400	56500	±200	195900	±400
Ca	4300	±70	17000	±140	29970	±180	25180	±170
Ti	250	±15	370	±20	—		410	±30
Fe	5380	±70	3350	±60	—		242100	±500
Cu	—		—		—		720	±30
Zn	2290	±50	5340	±70	820	±30	10180	±100
Br	540	±20	10170	±100	2130	±50	11330	±110
Rb	530	±70	4900	±10	1930	±80	8320	±130

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 48 – Espectro obtido para a amostra de tecido gengival coletado do Paciente C3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Neste último grupo, foi possível reforçar a hipótese de que os elementos enxofre e ferro são os principais marcadores da peri-implantite através dos pacientes que tiveram amostras de saliva coletadas em sulcos acometidos pela doença. Além disso, como visto para os três pacientes desse grupo as contagens de titânio são maiores na superfície do tecido gengival do que na saliva, reforçando a hipótese de que os íons de titânio corroídos dos implantes são absorvidos pela gengiva.

6.5 Paciente Controle

Além dos dez paciente já citados, um décimo primeiro paciente teve suas amostras coletadas e analisadas. Este paciente apresenta boa saúde bucal e vários implantes em boca, que fez uso por vários anos antes do momento da coleta. Ao contrário dos demais, este paciente não sofre de peri-implantite e dele foram coletadas seis amostras: uma do duto da glândula parótida, uma de saliva total e quatro de sulcos de implantes saudáveis. Os dados de contagens medidos para este paciente estão dispostos na Tabela 16 e ilustrados na Figura 49. Além disso, a Figura 50 traz um dos espectro obtidos para um dos sulcos de implantes saudáveis de onde houve coleta para este paciente.

Tabela 16 – Contagens médias e incertezas associadas medidas para o Paciente Controle.

	Parótida	Saliva Total	Sulco 1	Sulco 2	Sulco 3	Sulco 4
Al	—	450 ±40	—	—	—	—
P	6310 ±90	11190 ±110	4050 ±80	3550 ±70	3240 ±70	1740 ±60
S	1280 ±50	1950 ±60	7760 ±100	5850 ±90	4930 ±80	1030 ±50
Cl	160 ±40	13670 ±130	4260 ±80	3840 ±80	1680 ±60	1070 ±50
K	256400 ±500	346600 ±600	75400 ±300	85000 ±300	103000 ±300	93700 ±300
Ca	32950 ±190	21710 ±160	13290 ±120	25000 ±160	11390 ±110	15790 ±130
Ti	—	—	530 ±20	255 ±15	590 ±20	410 ±20
Fe	—	—	11280 ±110	1700 ±40	3540 ±60	1230 ±40
Zn	700 ±30	1340 ±40	2920 ±50	3900 ±60	2530 ±50	1250 ±40
Br	5680 ±80	13270 ±120	1820 ±40	2700 ±50	7940 ±90	6260 ±80
Rb	5610 ±100	7620 ±110	2690 ±80	3320 ±90	4390 ±90	3160 ±80

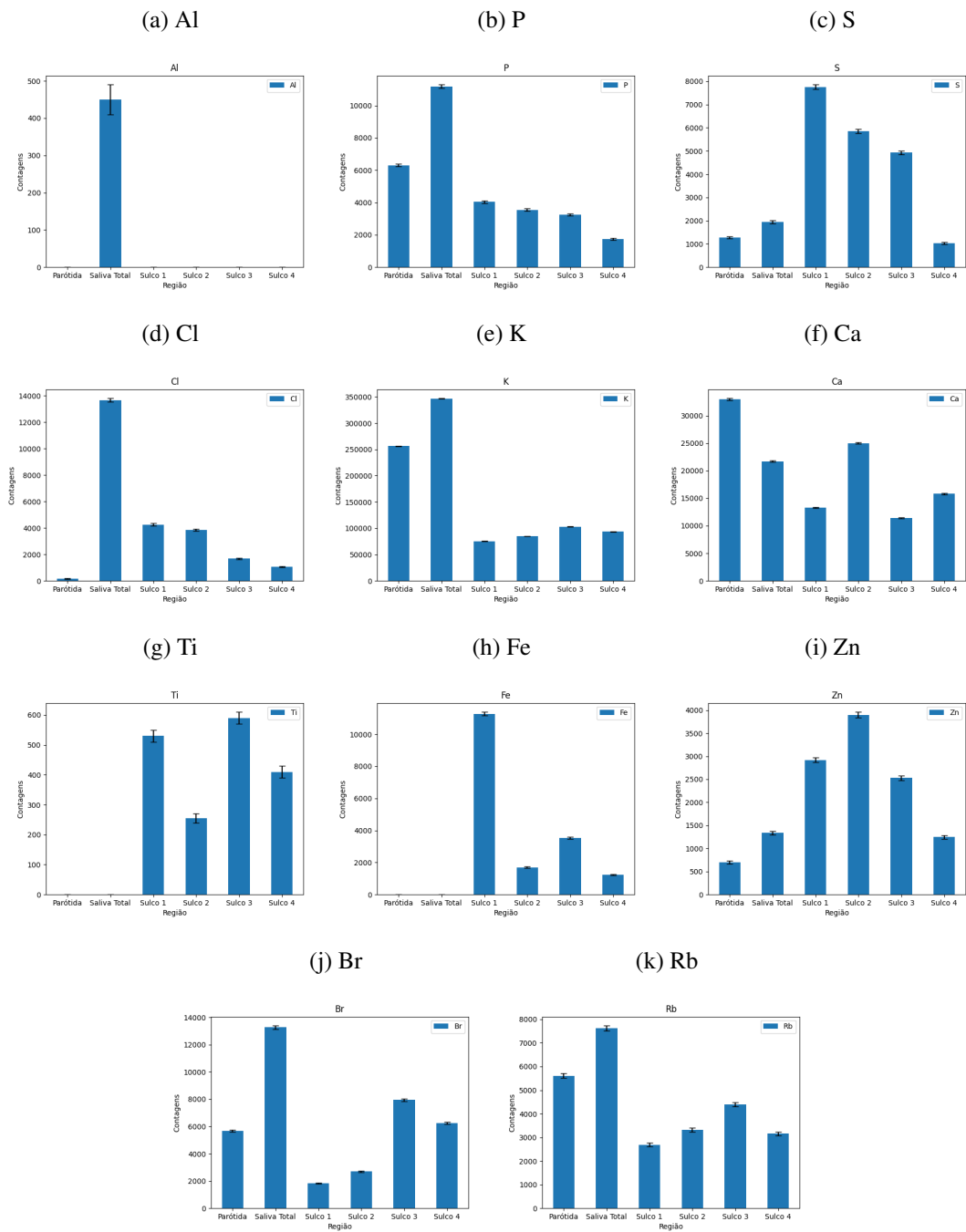
Fonte: elaborado pelo autor.

A amostra coletada na glândula parótida não apresenta contagens de ferro ou titânio (Figuras 49h e 49g), de modo que a presença destes elementos em outras regiões da boca podem ser atribuídas a fatores externos ao organismo. Para a amostra de saliva total, também não há presença de titânio, o que indica que não há corrosão dos implantes liberando partículas na saliva.

Apesar de todos os sulcos implantares serem considerados saudáveis, a região Sulco 1 apresenta tanto as maiores contagens de enxofre (Figura 49c) quanto de ferro (Figura 49h), o que pode indicar que esses dois implantes estejam mais propensos de desenvolver peri-implantite do que os demais caso não haja higiene e cuidado adequados.

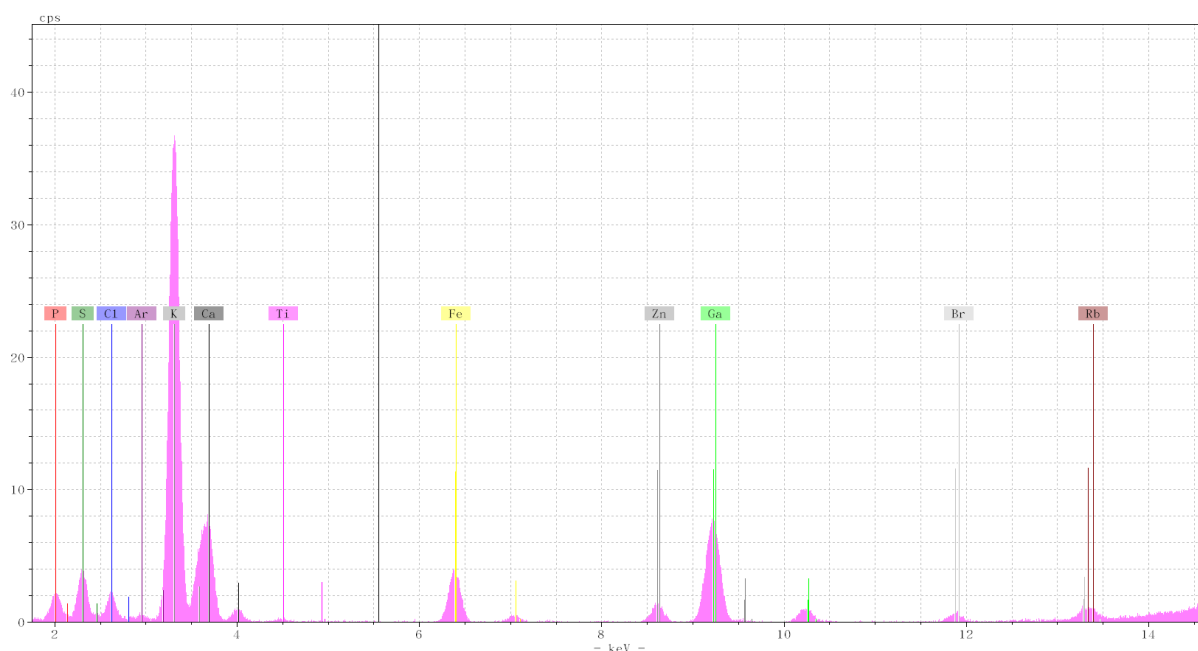
Na Seção 6.2 a alta contagem de ferro, cloro e enxofre foi atribuída à ação da peri-implantite, comparando os dados da Tabela 16 com os das Tabelas de 6 a 9 é possível verificar que, de modo geral, o paciente controle apresenta menores contagens para estes três elementos do que os pacientes acometidos pela doença, reforçando a tese de que a presença destes elementos é relacionada com a peri-implantite. Apesar de haver presença de titânio nas coletas dos sulcos de implantes saudáveis, os valores são baixos em comparação com os outros pacientes.

Figura 49 – Contagens medidas para os elementos detectados no Paciente Controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 50 – Espectro obtido para uma amostra de sulco de implante saudável coletado do Paciente Controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

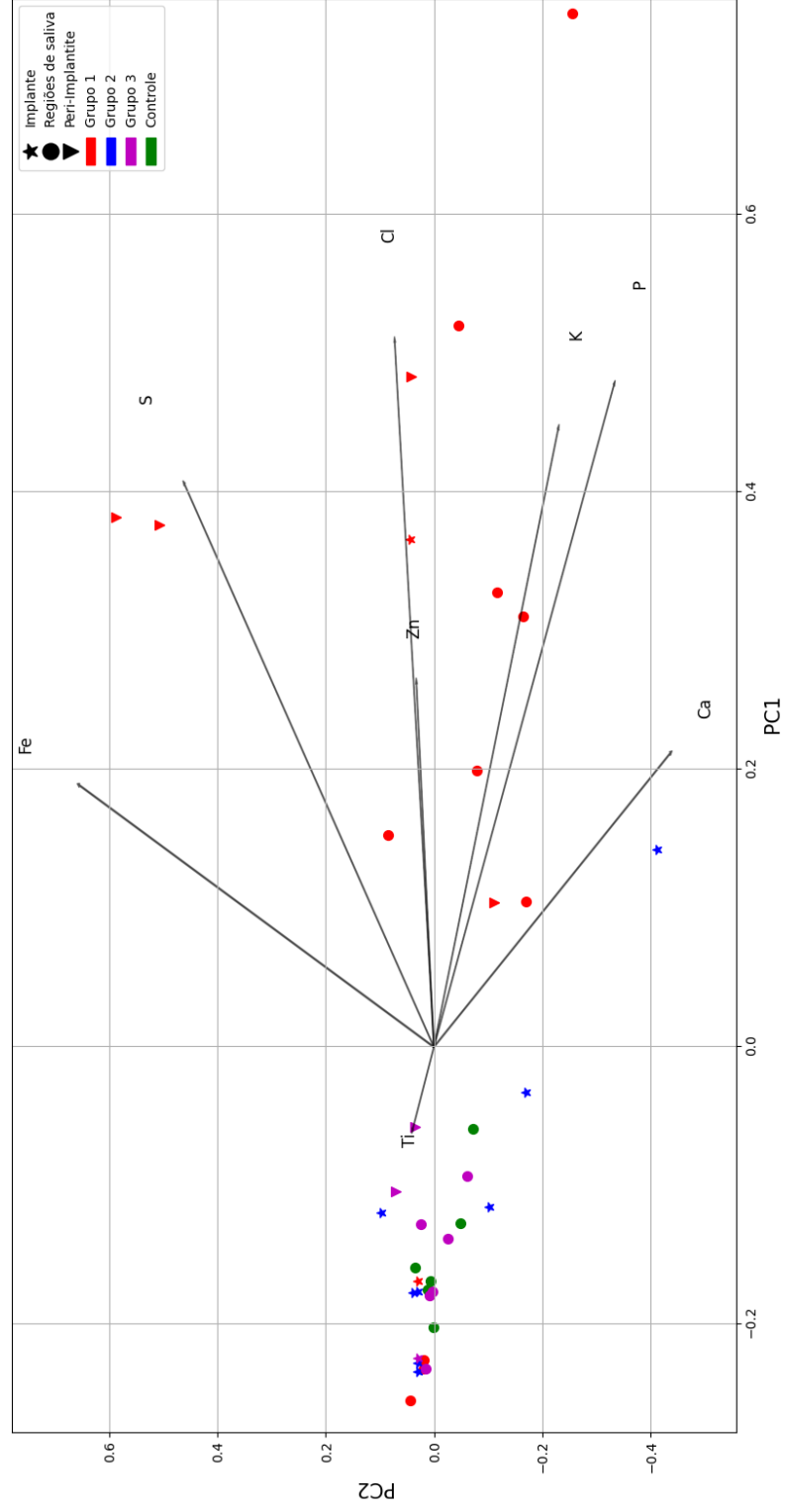
6.6 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) foi feita levando em consideração os dados de contagens medidos para as amostras. Os dados foram pré-processados pelo método de autoescalamento e a PCA foi feita utilizando o cálculo da decomposição de valores singulares (SVD). Tanto o pré-processamento quanto o cálculo da PCA foram feitos utilizando o programa Python, o código está disposto e comentado no Apêndice A.

Para evitar o enviesamento dos resultados, nem todos os elementos foram plotados, mas sim apenas aqueles que apareceram na maioria das amostras. Tais elementos são: P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn. Além disso, o titânio foi adicionado ao plot por ser um elemento de interesse. Tanto os *scores* quanto os *loadings* foram plotados para a PCA e o biplot está ilustrado na Figura 51. Os dados referentes aos Pacientes 7 não foram adicionados pois seria necessário adicionar Zr aos *loadings*, o que comprometeria a fidelidade dos resultados por ser a única a apresentá-lo na análise. Para os pacientes do Grupo 3, as amostras de tecido gengival não foram adicionadas por serem de natureza diferentes das coletas de saliva.

A plotagem foi feita utilizando apenas as duas primeiras componentes principais, maximizando a explicação da variação verificada ao longo dos dados. Ao todo nove PC's são formadas, uma para cada variável (elemento). A Figura 52 ilustra a taxa de variação explicada individual e cumulativa das PC's. A contagem no eixo das ordenadas deve ser feita como $i + 1$, sendo i o índice da PC, uma vez que o programa Python começa a contagem de elementos a partir de 0, e não 1. A variação explicada das PC's 1 e 2 são 37.14% e 17.56%, respectivamente, sendo a variação acumulada para essas duas de 54.71%, a maior variação acumulada possível

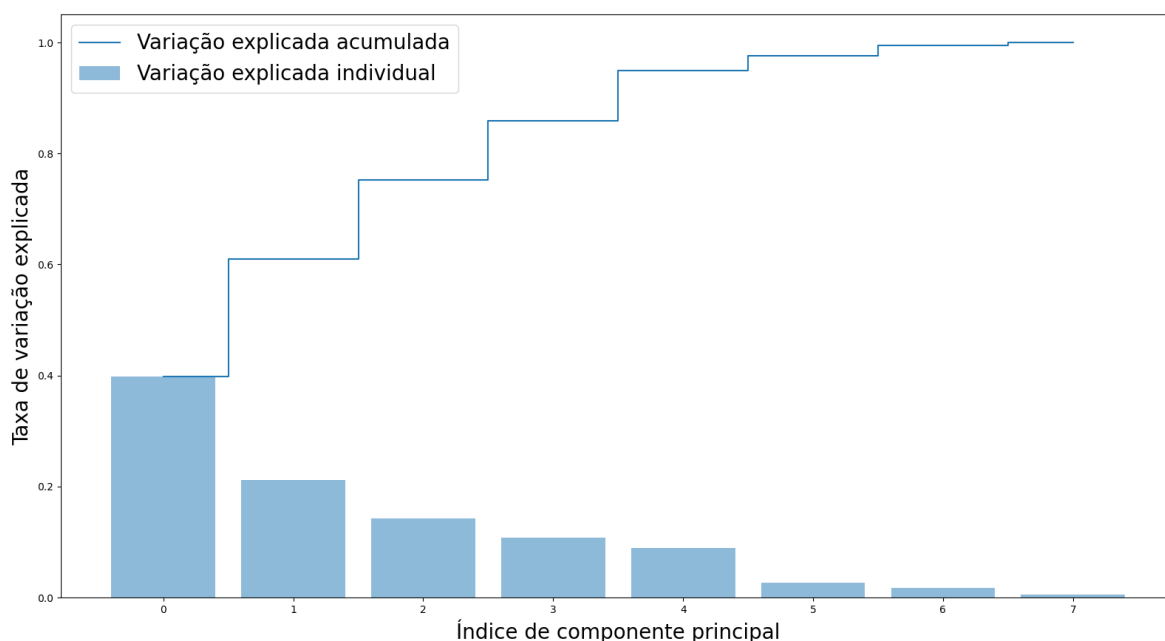
Figura 51 – Biplot da PCA para as contagens medidas.



Fonte: elaborado pelo autor.

para duas PC's nesse conjunto de dados.

Figura 52 – Taxa de variação explicada para cada uma das PC's.



Fonte: elaborado pelo autor.

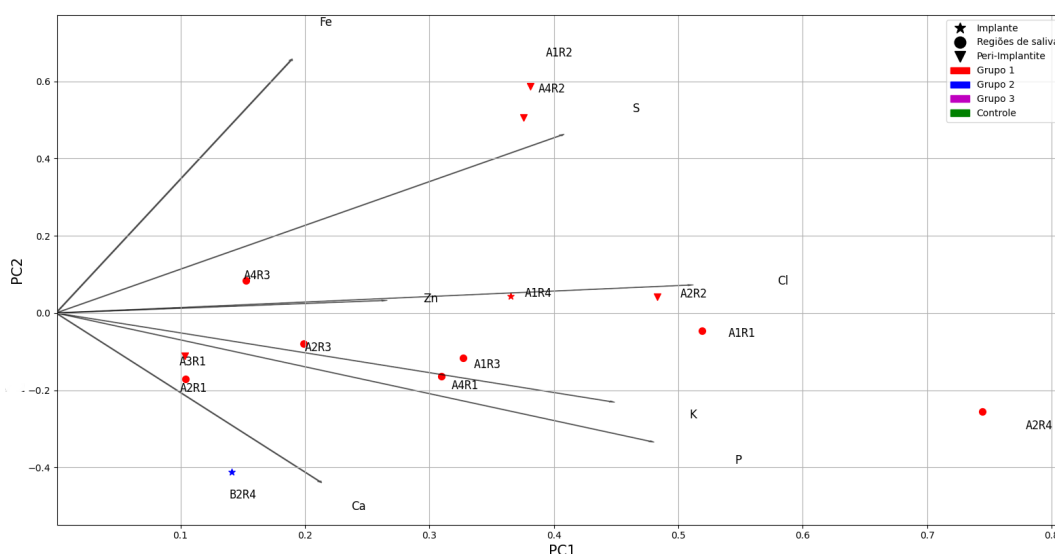
Como a legenda indica, os pontos vermelhos, azuis e verdes representam o Grupo 1, o Grupo 2 e o Paciente Saudável, respectivamente. Ao examinar a Figura 51 fica visível uma separação entre os dois grupos em função da influência do titânio. Os pontos marcados por estrelas representam amostras oriundas de implantes, os triângulos invertidos representam coletas de sulcos acometidos por peri-implantite e os círculos, demais regiões de coleta de saliva na boca.

No primeiro quadrante do gráfico (Figura 51) é possível notar que três das quatro amostras de peri-implantite apresentam um certo agrupamento em função das contagens de ferro, enxofre e cloro, os principais elementos relacionados com a peri-implantite e a resposta do organismo. O único ponto de peri-implantite fora desse possível agrupamento é o da Paciente 3 que, como discutido na seção apropriada, apresentou o comportamento mais discrepante dentro do grupo. Além disso, as três amostras de saliva do Grupo 1 misturadas com os pontos do Grupo 2 são as amostras de saliva desta paciente.

A única amostra referente ao Grupo 2 presente no eixo positivo da PC1 é a amostra coletada de implante como um todo da Paciente 6. Analisando a Figura 39 é possível notar que a amostra apresenta disparidade em relação às demais em função dos elementos cujos *loadings* estão representados na Figura 53.

A Figura 54 ilustra o eixo negativo da PC1 da PCA em mais detalhes. As amostras do Grupo 1 presentes neste lado são as amostras da glândula parótida, de mucosite peri-implantar e de saliva total da Paciente 3, além da amostra de interior de implante do Paciente 4. A presença

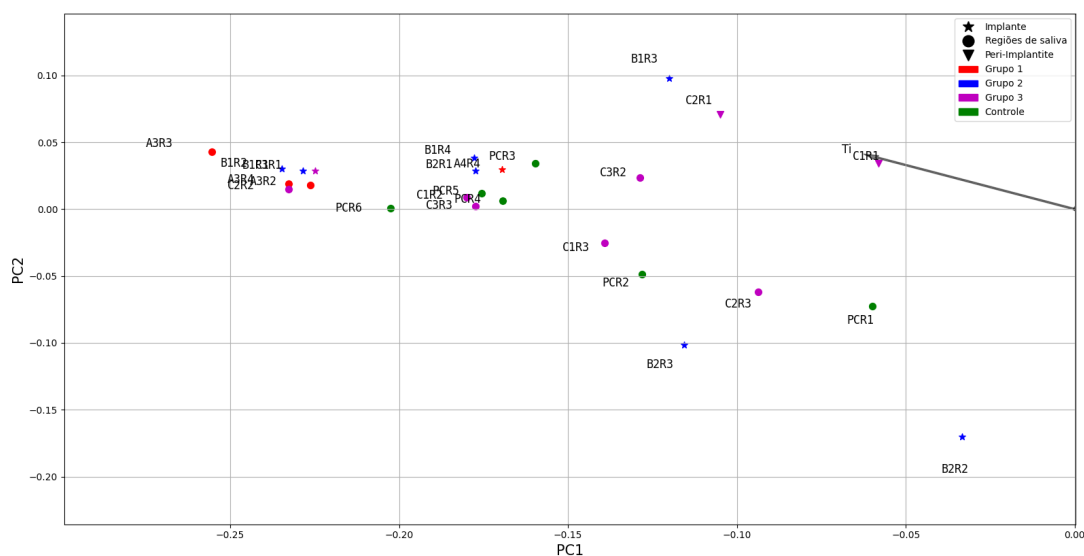
Figura 53 – Eixo positivo da PC1 da PCA para os dados de contagens.



Fonte: elaborado pelo autor.

desta última não é surpreendente, considerando que as amostras do Grupo 2 são oriundas de várias regiões de um mesmo implante.

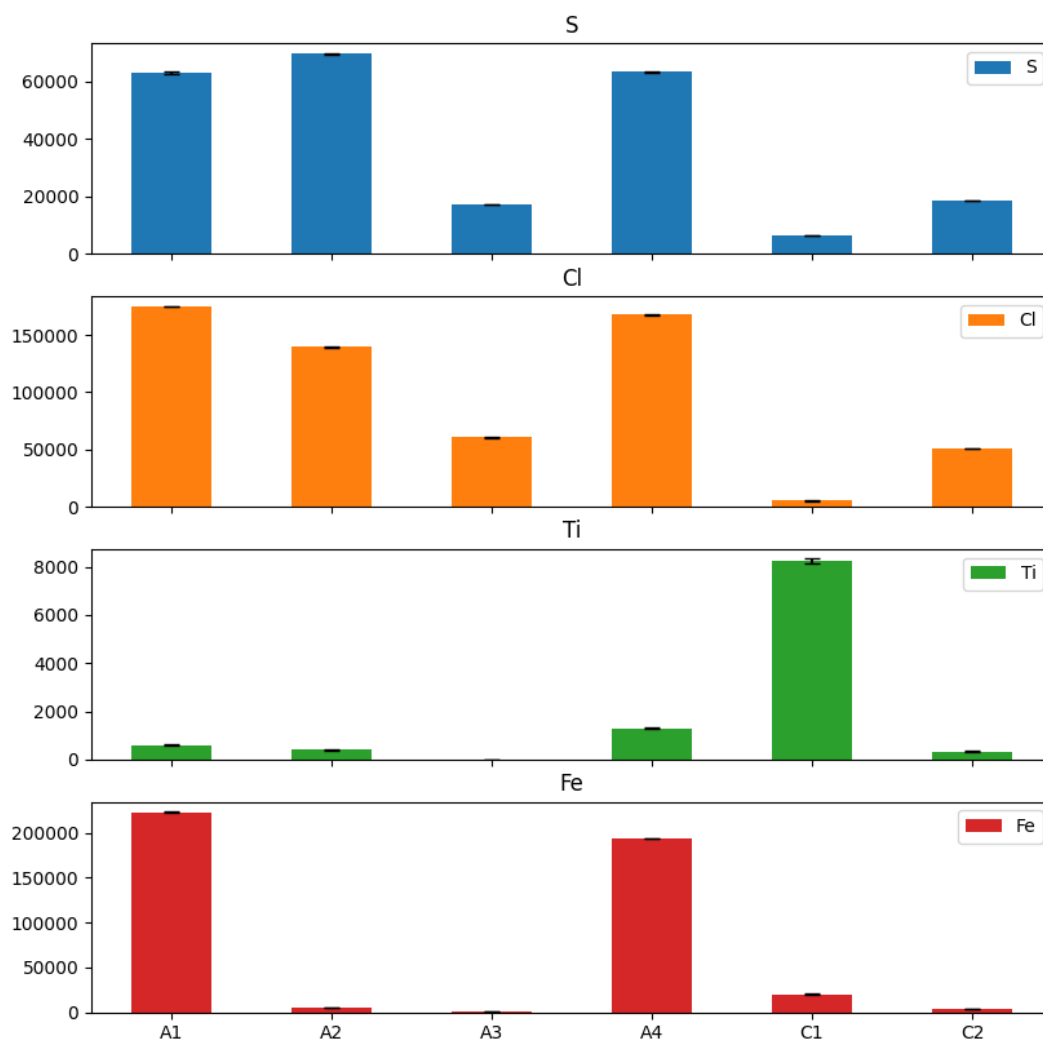
Figura 54 – Eixo negativo da PC1 da PCA para os dados de contagens.



Fonte: elaborado pelo autor.

As amostras da Paciente 3, entretanto, apesar de inesperadas são justificadas pelo comportamento distinto que as amostras coletadas nessa paciente apresentaram em relação ao demais pacientes do mesmo grupo. Todas as amostras do Paciente Saudável estão nesta região do biplot, mas as amostras da glândula parótida (PCR1) e de saliva total (PCR2) estão afastadas da aglomeração entre as amostras dos sulcos deste paciente com as amostras do Grupo 2 por conta da ausência de titânio.

Figura 55 – Contagens de enxofre, cloro, titânio e ferro para as amostras coletadas em sulcos com peri-implantite.



Fonte: elaborado pelo autor.

As amostras do Grupo 3 também estão todas distribuídas nessa região, inclusive aquelas oriundas de região de peri-implantite. Como o espaço amostral deste trabalho é pequeno, é difícil comportamentos que se estendam a largos grupos apesar de ser possível verificar tendências entre os as amostras semelhantes. Como descrito nas Seções 6.2 a 6.4 as amostras coletadas em sulcos de implantes afetados pela peri-implantite tendem a apresentar as maiores de contagem de enxofre, cloro e ferro do que as demais regiões. Apesar disso, o comportamento destes elementos entre as amostras desse mesmo tipo de região apresentam comportamentos variados. A Figura 55 mostra gráficos de barras para comparação das contagens destes três elementos e titânio entre as seis amostras de peri-implantite.

Apesar do comportamento dos elementos enxofre e cloro ser semelhante entre as amostras, o mesmo não pode ser dito para os demais pacientes. Os pacientes A1 e A4 apresentam contagens de ferro muito maiores do que os demais pacientes, ao passo que as contagens de

titânio do paciente C1 são muito maiores que os demais.

Tais comportamentos distintos entre amostras é suficiente para justificar a falta de agrupamento dessas amostras na Figura 51. Porém, o motivo para esse comportamento é incerto e pode ser atribuído a fatores biológicos de cada paciente como alimentação, saúde ou cuidados com a higiene bucal.

A realização da PCA permite verificar que o titânio não serve como marcador para a peri-implantite, como inicialmente suposto, uma vez que poucas amostras parecem ser caracterizadas por este elemento. Os elementos responsáveis por caracterizar a doença, portanto, aparentam ser enxofre, cloro e ferro.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados aqui apresentados, fica claro que a TXRF é uma técnica adequada para análise de amostras de saliva, uma vez que foi possível encontrar vários elementos e verificar alguns padrões entre as amostras coletadas. A análise individual de cada um dos pacientes permitiu verificar comportamentos semelhantes entre algumas pessoas, sendo eles:

- Maior presença de titânio nas amostras oriundas de implantes perdidos para a peri-implantite do que nas demais regiões;
- Maiores contagens de enxofre, ferro e cloro nas regiões sulcos acometidos por peri-implantite do que nas demais regiões;
- Maiores contagens de titânio na gengiva do que na saliva, indicando absorção do metal pelo tecido.

A presença de enxofre nas regiões de peri-implantite pode ser atribuída à ação das bactérias causadoras da doença. Analogamente, as concentrações de ferro e cloro podem ser atribuídas às células do sistema imunológico do corpo humano combatendo a infecção.

Tais comportamentos se repetiram ao realizar a análise de componentes principais (PCA), visto que as amostras de regiões semelhantes demonstraram tendências de agrupamento. Os resultados deste trabalho são promissores, e indicam que seja possível utilizar a TXRF para fazer diagnósticos de peri-implantite ao coletar e analisar a saliva oriunda de sulcos gengivais de onde se suspeita que ocorra ação da doença. Baseado nessa conclusão, existe a possibilidade de estender essa técnica para o diagnóstico de outras doenças que afetem o ambiente bucal.

Ao contrário do inicialmente suposto, as coletas de saliva realizadas em sulcos acometido por peri-implantite não têm uma presença muito alta de titânio. Em alguns casos, verificou-se até mesmo contagens maiores de titânio em um sulco saudável do que em um sulco doente. Apesar disso, foi possível caracterizar as regiões da doença em função de outros elementos.

Também foi possível estimar em que região de implantes a doença se mostrou mais aguda. Analisando os dados coletados do grupo cuja coleta de saliva foi feita em diversas regiões do implante perdido para a doença, as contagens de enxofre, ferro, cloro e zinco indicam a presença de bactérias e anticorpos.

REFERÊNCIAS

- [1] JEPSEN, S. et al. Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *Journal of clinical periodontology*, Wiley Online Library, v. 42, p. S152–S157, 2015.
- [2] SCHWARZ, F. et al. Peri-implantitis. *Journal of clinical periodontology*, Wiley Online Library, v. 45, p. S246–S266, 2018.
- [3] RODRIGUES, D. M. Manual de prótese sobre implantes. In: *Manual de prótese sobre implantes*. [S.l.: s.n.], 2007.
- [4] CASADO, P. L. et al. Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant dentistry*, LWW, v. 20, n. 3, p. 226–235, 2011.
- [5] SOLER, M. D. et al. Titanium corrosion in peri-implantitis. *Materials*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 13, n. 23, p. 5488, 2020.
- [6] JENKINS, R. *Quantitative X-ray spectrometry*. [S.l.]: CRC Press, 1995.
- [7] GRIFFITHS, D. J. *Introduction to electrodynamics*. [S.l.]: American Association of Physics Teachers, 2005.
- [8] PHILLIPS, M.; FRITZSCHE, H. *Electromagnetic Radiation*. 2020. <<https://www.britannica.com/science/electromagnetic-radiation>>. [Online; acesso em 27 de outubro de 2021].
- [9] LANDAU, E. L. L. *Curso de Física: Teoria do Campo*. [S.l.]: Hemus, 2002.
- [10] WOOTEN, M. Blackbody radiation. In: *Astro 801: Planets, Stars, Galaxies and the Universe*. <https://www.e-education.psu.edu/astro801/content/l3_p5.html>: PennState College of Earth and Mineral Sciences, 2019. [Online; acesso em 12 de abril de 2022].
- [11] EISBERG, R. Quantum physics of atoms, molecules, solids. 1986.
- [12] HAWKING, S. *Uma breve história do tempo*. [S.l.]: Editora Intrínseca, 2015.
- [13] GRIEKEN, R. V.; MARKOWICZ, A. *Handbook of X-ray Spectrometry*. [S.l.]: CRC press, 2001.
- [14] LIMA, R. d. S.; AFONSO, J. C.; PIMENTEL, L. C. F. Raios-x: fascinação, medo e ciência. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 32, n. 1, p. 263–270, 2009.
- [15] RÖNTGEN, W. Annalen der physik und chemie. *Neue Folge*, v. 64, n. 1, 1898.
- [16] SANTOS, C. A. dos. *A Descoberta dos Raios X*. 2002. <<http://www.if.ufrgs.br/tex/fis142/raiosx/rxhist.html>>. [Online; acesso em 27 de outubro de 2021].
- [17] ENOCH, N. *The doctor will see through you now: How a German physicist's accidental discovery led to the world's first human X-ray (of his wife's hand) and changed the face of medical diagnosis*. 2018. <<https://www.dailymail.co.uk/news/article-6491287/Roentgens-human-X-ray-wifes-hand-1895.html>>. [Online; acesso em 27 de outubro de 2021].

- [18] YOSHIMURA, E. M. Física das radiações: interação da radiação com a matéria. *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.
- [19] LEO, W. R. *Techniques for nuclear and particle physics experiments: a how-to approach*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012.
- [20] TAUHATA, L. et al. Radiation protection and dosimetry: basis. 9. 2013.
- [21] KNOLL, G. F. *Radiation detection and measurement*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.
- [22] WALENTA, T. Ç.-N. A. *Compton Coincidence Measurement*. 2005. <https://indico.cern.ch/event/426015/contributions/1047617/attachments/906081/1278753/Compton_experiment_2005.pdf>. [Online; acesso em 27 de junho de 2022].
- [23] CHARLTON, D. Inner shell ionization produced by the compton effect. *Radiation Research*, Academic Press, Inc., v. 88, n. 2, p. 420–425, 1981.
- [24] PANALYTICAL, M. *Fluorescência de raios X (XRF)*. <<https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/xray-analysis/x-ray-fluorescence>>. [Online; acesso em 04 de novembro de 2021].
- [25] APPOLONI, C. R. et al. Lfnatec: Publicação técnica do laboratório de física nuclear aplicada. v. 08, n. 01, p. 22, 2004.
- [26] CLETO, D. A. M. *Aplicação da Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) para Análise de Amostras de Saliva e Plasma de Atletas Pré e Pós Esforço Físico*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2017.
- [27] BECKHOFF, B. et al. *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2007.
- [28] FILHO, V. F. N. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios x por dispersão de energia (edxrf) e por reflexão total (txrf). *Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 1999.
- [29] CHANG, R. *Physical chemistry for the biosciences*. [S.l.]: University Science Books, 2005.
- [30] BRONDANI, P. B. *Ligações Químicas, Hibridização Polaridade, e Efeitos Químicos*. [S.l.]: Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- [31] DIRAC, P. A. M. *The principles of quantum mechanics*. [S.l.]: Oxford university press, 1981.
- [32] ENDO, L. Y. *Metodologia de análise quantitativa de solos arqueológicos através de TXRF*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2017.
- [33] ARAUJO, C. S. de. *Estudo de Cerâmicas de Senzalas dos Séculos XVIII e XIX de Campos de Goytacazes - RJ por EDXRF e Análise Multivariada*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2021.
- [34] BRUKER, A. *S2 PICOFOX*. [S.l.], 2009.
- [35] ZHAO, J.; WANG, X. Dental prostheses. In: *Advanced ceramics for dentistry*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 23–49.

- [36] SAINI, M. et al. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 3, n. 1, p. 52, 2015.
- [37] ACADEMY, I. D. *Materials Used for Dental Implant*. 2016. <<https://www.slideshare.net/indiandentalacademy/material-4implants-orthodontic-courses-by-indian-dental-academy>>. [Online; acesso em 13 de dezembro de 2021].
- [38] IMPLANTES, V. *Rejeição de implantes dentários: acontece?* 2017. <<https://blog.vitalimplantes.com.br/rejeicao-de-implantes-dentarios-acontece/>>. [Online; acesso em 15 de maio de 2022].
- [39] IMPLANTES, V. *Você sabe por que os implantes são feitos de titânio?* 2017. <<https://blog.vitalimplantes.com.br/voce-sabe-por-que-os-implantes-sao-feitos-de-titanio/>>. [Online; acesso em 15 de maio de 2022].
- [40] COAST Family Dental. <<https://cfdental.com.au/services/dental-implants/>>. [Online; acesso em 16 de maio de 2022].
- [41] BISSELL Dental Group. <<https://bisselldentalgroup.com/implant-dentistry/>>. [Online; acesso em 16 de maio de 2022].
- [42] LINDHE, J.; MEYLE, J.; PERIODONTOLOGY, G. D. of the European Workshop on. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *Journal of clinical periodontology*, Wiley Online Library, v. 35, p. 282–285, 2008.
- [43] LANG, N. P.; BERGLUNDH, T.; PERIODONTOLOGY, W. G. . of the Seventh European Workshop on. Periimplant diseases: where are we now?—consensus of the seventh european workshop on periodontology. *Journal of clinical periodontology*, Wiley Online Library, v. 38, p. 178–181, 2011.
- [44] PERSSON, G. R.; RENVERT, S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical implant dentistry and related research*, Wiley Online Library, v. 16, n. 6, p. 783–793, 2014.
- [45] MOMBELLI, A.; HASHIM, D.; CIONCA, N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? a critical review. *Clinical oral implants research*, Wiley Online Library, v. 29, p. 37–53, 2018.
- [46] MERCAN, S. et al. Titanium element level in peri-implant mucosa. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Taylor & Francis, v. 27, n. 4, p. 4002–4005, 2013.
- [47] HE, X. et al. Analysis of titanium and other metals in human jawbones with dental implants—a case series study. *Dental Materials*, Elsevier, v. 32, n. 8, p. 1042–1051, 2016.
- [48] TAWSE-SMITH, A. et al. Implications of wear at the titanium-zirconia implant-abutment interface on the health of peri-implant tissues. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 32, n. 3, 2017.
- [49] SAFIOTI, L. M. et al. Increased levels of dissolved titanium are associated with peri-implantitis—a cross-sectional study. *Journal of periodontology*, Wiley Online Library, v. 88, n. 5, p. 436–442, 2017.

- [50] OLMEDO, D. G. et al. Exfoliative cytology and titanium dental implants: a pilot study. *Journal of Periodontology*, Wiley Online Library, v. 84, n. 1, p. 78–83, 2013.
- [51] DELGADO-RUIZ, R.; ROMANOS, G. Potential causes of titanium particle and ion release in implant dentistry: a systematic review. *International journal of molecular sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 19, n. 11, p. 3585, 2018.
- [52] MATHEW, M. T. et al. What is the role of lipopolysaccharide on the tribocorrosive behavior of titanium? *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Elsevier, v. 8, p. 71–85, 2012.
- [53] CLETO, D. A. M. et al. Analysis of saliva and gingival crevice fluid by total reflection x-ray fluorescence (txrf). *X-Ray Spectrometry*, Wiley Online Library, v. 45, n. 4, p. 220–224, 2016.
- [54] KIM, K. T. et al. General review of titanium toxicity. *International journal of implant dentistry*, SpringerOpen, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2019.
- [55] ZAHR, P. *Implante com prótese de zircônia: veja as principais vantagens*. 2020. <<https://blog.odontocompany.com/implante-com-protese-de-zirconia-veja-as-principais-vantagens/>>. [Online; acesso em 15 de maio de 2022].
- [56] COLON, L. Analysis of body fluids: urine, blood, saliva and tears. In: *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*. [S.l.]: Springer, 1997. p. 486–498.
- [57] POLETO, A. C. et al. Relationship of levels of trace elements in saliva and dental caries in preschool children using total reflection x-ray fluorescence technique (txrf). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Elsevier, v. 63, p. 126663, 2021.
- [58] ANTONIO, R. R. J. et al. Oral health status and trace elements in saliva of children and teenagers with intellectual disabilities: A preliminary study. *Oral Health*, v. 4, p. 1–4, 2019.
- [59] DUGGAL, M.; CHAWLA, H.; CURZON, M. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. *Archives of oral biology*, Elsevier, v. 36, n. 12, p. 881–884, 1991.
- [60] BEELEY, J. A. Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Elsevier, v. 569, n. 1-2, p. 261–280, 1991.
- [61] NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. [S.l.]: Bookman Editora, 2010.
- [62] FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. [S.l.]: Editora da UNICAMP, 2015.
- [63] BRERETON, R. G. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2003.
- [64] SANTOS, F. R. dos. *Uso da Fluorescência de Raios X e Análise Multivariada na Determinação de Atributos de Fertilidade de Solos em um Topossequência Derivada do Basalto*. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Londrina, 2020.

- [65] JOLLIFFE, I. T. *Principal component analysis for special types of data*. [S.l.]: Springer, 2002.
- [66] MELQUIADES, F. L. *Notas de aula de Planejamento e Análise de Experimentos*. [S.l.]: Universidade Estadual de Londrina, 2020.
- [67] ABRAHAM, J. A. et al. Txrf analysis of metals in oral fluids of patients with dental implants. *X-Ray Spectrometry*, Wiley Online Library, v. 43, n. 4, p. 193–197, 2014.
- [68] HUSSEIN, A. et al. Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in shah alam, malaysia. *European journal of paediatric dentistry*, v. 14, n. 2, p. 113–118, 2013.
- [69] BORELLA, P.; FANTUZZI, G.; AGGAZZOTTI, G. Trace elements in saliva and dental caries in young adults. *Science of the total environment*, Elsevier, v. 153, n. 3, p. 219–224, 1994.
- [70] ZAHIR, S.; SARKAR, S. et al. Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, Medknow Publications, v. 24, n. 1, p. 27, 2006.
- [71] WATANABE, K. et al. Mn and cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Elsevier, v. 23, n. 2, p. 93–99, 2009.
- [72] WATANABE, K. et al. Al and fe levels in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth and restorations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Elsevier, v. 25, n. 3, p. 143–148, 2011.
- [73] HEGDE, M. et al. Biochemical indicators of dental caries in saliva: an in vivo study. *Caries Research*, Karger Publishers, v. 48, n. 2, p. 170–173, 2014.
- [74] KORMAS, I. et al. Peri-implant diseases: diagnosis, clinical, histological, microbiological characteristics and treatment strategies. a narrative review. *Antibiotics*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 9, n. 11, p. 835, 2020.
- [75] CARMO, R. L. do. *Glândulas Salivares*. 2022. <<https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/glandulas-salivares>>. [Online; acesso em 13 de fevereiro de 2022].
- [76] FGM Dental Group. <<https://fgmdentalgroup.com/produtos-implantes/base-de-titanio>>. [Online; acesso em 19 de maio de 2022].
- [77] CARNIDE, C. *Papanicolau*. 2020. <<https://www.saudebemestar.pt/pt/clinica/ginecologia/papanicolau/>>. [Online; acesso em 20 de julho de 2022].
- [78] Swann Morton. *BISTURÍ LÂMINA Nº15C - Swann Morton*. <<https://www.dentaltix.com/pt/swann-morton/bisturi-folha-no15c-100u>>. [Online; acesso em 23 de junho de 2022].
- [79] CALLE, I. D. L. et al. Sample pretreatment strategies for total reflection x-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Elsevier, v. 90, p. 23–54, 2013.

- [80] EDUCAÇÃO, H. *Neutrófilos e Macrófagos: o que são?* 2021. <<https://cursinhoparamedicina.com.br/blog/biologia/neutrofilos-e-macrofagos-o-que-sao/>>. [Online; acesso em 15 de maio de 2022].
- [81] YOSHIDA, A. et al. Hydrogen sulfide production from cysteine and homocysteine by periodontal and oral bacteria. *Journal of periodontology*, Wiley Online Library, v. 80, n. 11, p. 1845–1851, 2009.
- [82] GULER, B. et al. Chemical evaluation of energy dispersive x-ray spectroscopy analysis of different failing dental implant surfaces: A comparative clinical trial. *Materials*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 14, n. 4, p. 986, 2021.
- [83] SEJDINI, M. et al. The role and impact of salivary zn levels on dental caries. *International Journal of Dentistry*, Hindawi, v. 2018, 2018.
- [84] SAÚDE, T. *Tártaro: o que é, sintomas, causas e como remover*. 2021. <<https://www.tuasaude.com/tartaro-nos-dentes/>>. [Online; acesso em 15 de maio de 2022].
- [85] BHOWMICK, S. et al. Is saliva a potential biomarker of arsenic exposure? a case-control study in west bengal, india. *Environmental science & technology*, ACS Publications, v. 47, n. 7, p. 3326–3332, 2013.
- [86] World Health Organization. *Arsenic*. 2018. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>>. [Online; acesso em 24 de julho de 2022].
- [87] BSEF. *Bromine compounds are used in drugs and as a catalyst for the manufacturing of pharmaceuticals*. <<https://www.bsef.com/uses-innovations/pharmaceuticals-production/>>. [Online; acesso em 10 de junho de 2022].
- [88] CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Brazilian oral research*, SciELO Brasil, v. 23, p. 23–30, 2009.
- [89] SCHAMSCHULA, R. et al. Who study of dental caries etiology in papua new guinea. World Health Organization, 1978.
- [90] MARÍN-MARTÍNEZ, L.; MOLINO-PAGÁN, D.; LÓPEZ-JORNET, P. Trace elements in saliva and plasma of patients with type 2 diabetes: Association to metabolic control and complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, Elsevier, v. 157, p. 107871, 2019.
- [91] STAATS, K. A. et al. Rapamycin increases survival in als mice lacking mature lymphocytes. *Molecular neurodegeneration*, BioMed Central, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2013.
- [92] NUNES, S. M. G. O uso de imunossupressores como possíveis tratamentos para doenças neurodegenerativas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2015. Trabalho de Conclusão de Curso.
- [93] IQBAL, K. et al. Role of different ingredients of tooth pastes and mouthwashes in oral health. *Jpda*, v. 20, n. 3, p. 163–170, 2011.

A PROGRAMA

O código utilizado para fazer e plotar o gráfico da PCA está listado e comentado abaixo.

```

1  # Bibliotecas utilizadas
2  import numpy as np
3  import matplotlib.pyplot as plt
4  from sklearn import datasets
5  from sklearn.decomposition import PCA
6  import pandas as pd
7  from sklearn.preprocessing import StandardScaler
8  import matplotlib.patches as mpatches
9  import matplotlib.lines as mlines
10
11 # Chama o arquivo com os dados de contagens
12 df_old = pd.read_excel('Tudo_contagens.xlsx')
13 df = df_old.fillna(0)
14
15 # Define os elementos e amostras a serem chamados
16 features = ['P', 'S', 'Cl', 'K', 'Ca', 'Ti', 'Fe', 'Zn']
17 samples = ['A1R1', 'A1R2', 'A1R3', 'A1R4', 'A2R1', 'A2R2', 'A2R3', 'A2R4',
18           'A3R1', 'A3R2', 'A3R3', 'A3R4', 'A4R1', 'A4R2', 'A4R3', 'A4R4',
19           'B1R1', 'B1R2', 'B1R3', 'B1R4', 'B2R1', 'B2R2', 'B2R3', 'B2R4',
20           'PCR1', 'PCR2', 'PCR3', 'PCR4', 'PCR5', 'PCR6', 'C1R1', 'C1R2',
21           'C1R3', 'C2R1', 'C2R2', 'C2R3', 'C3R1', 'C3R2', 'C3R3']
22 targets = ['Grupo 1', 'Grupo 2', 'Saudável', 'Grupo 3']
23
24 # Define as amostras e variáveis para a PCA e faz o autoescalamento
25 x = df.loc[:, features].values
26 y = df.loc[:, ['Elementos']].values
27 X = StandardScaler().fit_transform(x)
28 scaler = StandardScaler()
29 scaler.fit(X)
30 X = scaler.transform(X)
31 pca = PCA()
32 x_new = pca.fit_transform(X)
33
34 # Função para plotagem dos scores
35 def myplot(score, coeff, labels=None):

```

```

36 xs = score[:, 0]
37 ys = score[:, 1]
38 n = coeff.shape[0]
39 scalex = 1.0/(xs.max() - xs.min())
40 scaley = 1.0/(ys.max() - ys.min())
41
42 # Definição das cores e marcadores para cada tipo de amostra
43 color = ['r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r', 'r',
44          'r', 'r', 'r', 'r', 'b', 'b', 'b', 'b', 'b', 'b', 'b', 'b', 'b',
45          'g', 'g', 'g', 'g', 'g', 'g', 'g', 'm', 'm', 'm', 'm', 'm', 'm', 'm', 'm',
46          'm', 'm', 'm', 'm']
47 markers = ["o", "v", "o", "*", "o", "v", "o", "o", "v", "o", "o", "o",
48            "o", "v", "o", "*", "*", "*", "*", "*", "*", "*", "*",
49            "o", "o", "o", "o", "o", "o", "v", "o", "o", "v", "o", "o",
50            "*", "o", "o"]
51
52 # Gera o scatterplot com os scores
53 for xp, yp, c, m in zip(xs, ys, color, markers):
54     plt.scatter(xp * scalex, yp * scaley, color=c, marker=m)
55
56 # Identifica o nome de cada ponto do scatter
57 for i in range(len(samples)):
58     plt.text(x_new[i, 0] * 0.12, x_new[i, 1] * 0.12, samples[i],
59             color='black', ha='center', va='center', fontsize=6,
60             fontfamily='monospace')
61
62 # Adiciona os loadings ao scatterplot
63 for i in range(n):
64     plt.arrow(0, 0, coeff[i, 0], coeff[i, 1], color='black', alpha=0.5)
65     if labels is None:
66         plt.text(coeff[i, 0] * 1.15, coeff[i, 1] * 1.15, features[i],
67                 color='black', ha='center', va='center')
68     else:
69         plt.text(coeff[i, 0] * 1.15, coeff[i, 1] * 1.15, labels[i],
70                 color='black', ha='center', va='center')
71
72 # Determina o tamanho do gráfico e legendas dos eixos
73 plt.xlim(-1, 1)
74 plt.ylim(-1, 1)
75 plt.xlabel("PC{}".format(1), fontsize=15)
76 plt.ylabel("PC{}".format(2), fontsize=15)

```

```

77     plt.grid()
78
79
80     # Chama a função usando apenas as 2 primeiras PC's
81     myplot(x_new[:, 0:2], np.transpose(pca.components_[0:2, :]))
82
83     # Definição da legenda e chamada do gráfico
84     black_star = mlines.Line2D([], [], color='black', marker='*',
85                               linestyle='None', markersize=10, label='Implante')
86     black_circle = mlines.Line2D([], [], color='black', marker='o',
87                                  linestyle='None', markersize=10, label='Regiões de saliva')
88     black_triangle = mlines.Line2D([], [], color='black', marker='v',
89                                   linestyle='None', markersize=10, label='Peri-Implantite')
90     red_patch = mpatches.Patch(color='red', label='Grupo 1')
91     blue_patch = mpatches.Patch(color='blue', label='Grupo 2')
92     green_patch = mpatches.Patch(color='green', label='Saudável')
93     magenta_patch = mpatches.Patch(color='m', label='Grupo 3')
94
95     plt.legend(handles=[black_star, black_circle, black_triangle,
96                       red_patch, blue_patch, magenta_patch, green_patch])
97     plt.show()

```

A adição das seguintes linhas ao fim do código acima fornece o gráfico das variações explicadas das PC's:

```

1     # Determina variação explicada
2     exp_var_pca = pca.explained_variance_ratio_
3
4     # Faz a soma cumulativa do autovalores da variação
5     cum_sum_eigenvalues = np.cumsum(exp_var_pca)
6
7     # Cria o plot
8     plt.bar(range(0, len(exp_var_pca)), exp_var_pca, alpha=0.5, align='center',
9            label='Variação explicada individual')
10    plt.step(range(0, len(cum_sum_eigenvalues)), cum_sum_eigenvalues, where='mid',
11           label='Variação explicada acumulada')
12    plt.ylabel('Taxa de variação explicada', fontsize=20)
13    plt.xlabel('Índice de componente principal', fontsize=20)
14    plt.legend(loc='best', fontsize=20)

```

```
15 plt.tight_layout()
16 plt.show()
```