



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**ALLYNE JORCELINO DALOIA DE CARVALHO**

**ANÁLISE QUÍMICA IN VIVO DE DENTINA  
SADIA E CARIADA DE PACIENTES  
IRRADIADOS DE CABEÇA E PESCOÇO**

**UBERLÂNDIA  
2019**

ALLYNE JORCELINO DALOIA DE CARVALHO

**ANÁLISE QUÍMICA IN VIVO DE DENTINA SADIA E  
CARIADA DE PACIENTES IRRADIADOS DE  
CABEÇA E PESCOÇO**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Faculdade de  
Odontologia da UFU, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Graduada em Odontologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana  
Resende Novais Simamoto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila de  
Carvalho Almança Lopes

UBERLÂNDIA  
2019

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me permitido trilhar este caminho sempre com muita dedicação e esforço, e por nunca ter faltado fé. Agradeço aos meus pais, Jarbas e Mara, pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre acreditarem no meu sonho e permitirem que eu estivesse aqui durante esses cinco anos. Agradeço a minha irmã Giovanna e aos meus amigos Aline, Jéssica, Thalles, Kássia e Beathriz que estiveram ao meu lado de uma forma muito especial por todos esses anos, e a 81ª turma de Odontologia UFU, minha turma maravilhosa que guardarei eternamente no coração. Agradeço a meus amigos de outras turmas que a faculdade me permitiu conhecer. Agradeço aos professores, por terem sido minha base e proporcionar todos os conhecimentos que tenho até aqui, em especial, às professoras Germana, Maria Antonieta e Camilla Moura, e ao professor Ronan. Agradeço à Liga de Odontopediatria e à professora Alessandra, por permitir experiências além da graduação. E por fim, agradeço imensamente a minha professora e orientadora Veridiana e a minha co-orientadora Camila por toda a paciência, pelo carinho em ensinar e por me apresentarem o mundo da pesquisa, sou muito grata por ter ficado em ótimas mãos na realização dos trabalhos durante minha graduação.

## Sumário

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO .....	7
OBJETIVOS .....	9
MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
I- Revisão de literatura .....	10
II. Obtenção, seleção e armazenamento dos dentes .....	13
III- Preparo dos dentes .....	14
IV- Síntese Metodológica .....	15
V- Análise Estatística .....	17
RESULTADOS .....	18
FTIR .....	18
EDS .....	20
DISCUSSÃO .....	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	25
AGRADECIMENTOS .....	26
REFERÊNCIAS .....	27

## RESUMO

A cárie relacionada à radiação é um dos principais efeitos colaterais tardios da radioterapia de cabeça e pescoço. Ela é considerada uma doença única devido as suas características de instalação, progressão e aspecto clínico. Este trabalho objetivou avaliar diferença na composição química da cárie relacionada à radiação em comparação à carie comum. Dez pré-molares cariados foram criteriosamente selecionados, sendo 5 de pacientes não irradiados, e 5 de pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço. Avaliou-se a dentina sadia e a cariada em cada dente por meio das espectroscopias de Infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) e de energia dispersiva (EDS). Os parâmetros analisados pelo FTIR foram: razão fosfato/amida I, razão carbonato/mineral, razão amida I/amida III. A partir do EDS, calculou-se a razão Ca/P. FTIR revelou menores valores da razão fosfato/amida I para dentina afetada por cárie e irradiada. Para a razão carbonato/mineral, apenas a interação entre os fatores de estudo foi significativa ( $p=0,035$ ). Revelou maiores valores da razão carbonato/mineral para o grupo irradiado e menores valores da dentina sadia e afetada por cárie no grupo irradiado. A razão amida I/amida III mostrou diferença significativa apenas para a cárie ( $p=0,005$ ). A dentina afetada por cárie mostrou uma proporção maior que a dentina sadia. EDS revelou uma interação significativa para dos valores de Ca e P ( $p=0,036$  e  $p=0,020$ , respectivamente) entre os fatores irradiação e cárie, com dentina sadia não irradiada apresentando maiores valores de Ca e P do que a dentina afetada por cárie não irradiada. Para os valores da razão Ca/P, houve uma diferença significativa para a irradiação ( $p=0,01$ ). Entretanto, o fator cárie ( $p=0,252$ ) e a interação entre os fatores não foram significantes ( $p=0,445$ ). Valores menores da razão Ca/P foram registrados para a dentina irradiada em comparação com a dentina não irradiada. Conclui-se que a cárie altera a composição química da dentina, contudo na cárie relacionada à radiação essas mudanças ocorrem de forma mais agressiva.

Palavras-chave: cárie dentária, espectroscopia, radioterapia.

## ABSTRACT

Radiation-related caries is one of the major late side effects of head and neck radiotherapy. It is considered a single disease due to its characteristics of installation, progression and clinical aspect. This work aimed to evaluate the difference in the chemical composition of caries related to radiation in comparison to normal caries. Ten carious premolars were carefully selected, of which 5 were non-irradiated and 5 were irradiated in the head and neck region. Carious and healthy dentin were evaluated in each tooth by means of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and dispersive energy (EDS) spectroscopies. The parameters analyzed by FTIR were: phosphate/amide I ratio, carbonate/mineral ratio and amide I/amide III ratio. From EDS, the Ca/P ratio was calculated. FTIR revealed lower values of phosphate/amide I ratio for caries-affected and irradiated dentin. For carbonate/mineral ratio, only the interaction between the study factors was significant ( $p=0.035$ ). FTIR revealed higher carbonate/mineral ratio values for the non-irradiated group and there was a decrease in sound dentin and caries affected dentin in the irradiated group. Amide I/amide III ratio showed significant difference only for caries ( $p=0.005$ ). Caries affected dentin showed a greater ratio than sound dentin. EDS revealed values of Ca and P statistically significant ( $p=0.036$  and  $p=0.020$ , respectively) between the irradiation and caries factors, with non-irradiated sound dentin presenting higher values of Ca and P than non-irradiated caries affected dentin. For Ca/P ratio values, EDS revealed a statistically significant difference between irradiation ( $p=0.01$ ). However, the factor caries ( $p=0.252$ ) and the interaction between factors was not statistically significant ( $p=0.445$ ). Lower values of Ca/P ratio was registered for irradiated dentin compared to non-irradiated. It was concluded that caries changes the chemical composition of dentin, and that in radiation related caries these changes occur more aggressively.

Key words: dental caries, radiotherapy, spectroscopy.

## INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (INCA, 2018). Sua origem se dá por condições multifatoriais que podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, do Ministério da Saúde, em sua estimativa de 2018, eram esperados aproximadamente 14.700 novos casos de câncer de boca, sendo 11.200 homens e 3.500 mulheres no ano de 2018 (INCA, 2018).

Há diversas formas de tratamento do câncer, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (Beumer, Curtis e Marunick, 1996). A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes (Pro-Onco, 1993). A radiação ionizante, apesar de apresentar a vantagem de preservar a estrutura dos tecidos, por não ser um tratamento invasivo, acarreta inúmeras reações adversas que afetam de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes, podendo interferir inclusive no andamento do tratamento (Spetch *et al.*, 2002; Vissink *et al.*, 2003). A intensidade destas reações irá depender do volume, do local irradiado, da dose total, do fracionamento da dose, da idade, das condições clínicas do paciente e dos tratamentos associados (Caccelli & Raport 2008). Sinais e sintomas incluindo mucosites (Denham, 1999), hipossalivação e conseqüente xerostomia (Thomson, 2007), osteoradionecrose (Notani *et al.*, 2003) e cáries de irradiação (Kielbassa, 2006), são comumente relatados na região de cabeça e pescoço.

A cárie relacionada à radiação é decorrente de efeitos indiretos e diretos da radioterapia. Dentre os efeitos indiretos pode-se citar as mudanças induzidas pela radiação no tecido das glândulas salivares que resultam em hipossalivação, composição salivar alterada, diminuição do pH, redução da capacidade de tamponamento, aumento da viscosidade, mudança na flora bucal em direção a bactérias cariogênicas (*S. mutans*, lactobacilos), e mudanças na dieta (Otmani, 2007). A mucosite é um preocupante efeito agudo conseqüente da radioterapia, que resulta em dor, disfagia, maior risco à infecções e alterações no estado nutricional do paciente (Pakravan, 2019). A

cárie relacionada à radiação ocorre em locais diferentes do que em cárie dental comum. Os locais mais afetados pós- radioterapia são as superfícies labiais da região cervical, cúspides e incisais (Walker et al., 2011).

A cárie relacionada à radiação pode se desenvolver de repente, mudando a cor e a translucidez da superfície dental e é considerada uma doença única devido sua rápida progressão e alto potencial de destruição, podendo levar a perda da dentição total em um curto período de tempo e curiosamente não está associada a dor severa. (Kielbassa, 2004; Silva, 2009). Além do mais, a radiação gera efeitos diretos sobre a estrutura dental, que resultam em modificações de esmalte e dentina, incluindo alterações mecânicas e descalcificação acelerada dos tecidos mineralizados (Galvão-Moreira, 2015).

Nesse contexto, a hipótese nula deste estudo foi de que a cárie relacionada à radiação não se diferencia quimicamente da cárie comum.

## OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar a dentina afetada por cárie em pacientes comuns e pacientes submetidos à radioterapia devido ao câncer de cabeça e pescoço, quanto à sua composição química, variando:

### I – Irradiação

- a. Grupo irradiado
- b. Grupo não irradiado

### II – Tipo de dentina

- a. Dentina sadia
- b. Dentina afetada por cárie

### Delineamento experimental

**Unidade experimental:** pré-molares extraídos e cariados de pacientes não irradiados, pré-molares extraídos e cariados de pacientes irradiados.

**Fator em estudo:** Irradiação em dois níveis (Dentina não irradiada e cariada; e Dentina irradiada e cariada)

**Variável resposta:** Composição química

**Método de análise:** Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR)

**Método estatístico:** Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal (Shapiro-Wilk) e teste de igualdade de variâncias (teste de Levene). Os parâmetros fosfato/amida I, carbonato/mineral e amida I/amida III foram analisados usando ANOVA Two-Way (variando radiação e tipo de dentina). Para todos os testes empregou-se um nível de significância estatística de 0,05 e todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SigmaPlot® Sistema versão 12.0 (Systat Institute Inc., de San Jose, CA, EUA).

**Amostragem:** 10 unidades amostrais, sendo 5 do grupo irradiado e 5 do grupo não irradiado.

## MATERIAIS E METÓDOS

### *I- Revisão de literatura*

A radioterapia é uma modalidade de tratamento para tumores malignos em que as radiações ionizantes agem sobre o DNA nuclear levando à morte ou à perda da sua capacidade reprodutiva. Muitos dos pacientes que apresentam câncer de cabeça e pescoço são submetidos a altas doses de radioterapia em extensos campos de radiação que irão incluir a cavidade bucal, maxila, mandíbula e glândulas salivares (Jham e Freire, 2006).

São causados grandes danos radioativos às glândulas salivares, o que resulta em disfunção das glândulas por morte celular e fibrose. A consequência é a hipossalivação e a xerostomia, que geram diversos problemas funcionais na cavidade oral, afetando a fala e o paladar, além de dificuldade na mastigação e deglutição, e propiciar o desenvolvimento de infecções como candidíases, gengivites e aumentar o risco de cárie. (Beech *et al*, 2014).

Silva *et al.* realizaram um estudo em 2009 com 36 dentes humanos permanentes que foram extraídos de 11 pacientes com doença periodontal avançada que haviam realizado tratamento de radioterapia em região de cabeça e pescoço, com mais de 50 Gy de radiação. Uma porção significativa das amostras apresentava descoloração marrom em intensidades variáveis em superfícies de esmalte e raiz, e cárie cervical foi vista macroscopicamente em 78% dos espécimes. A microscopia por luz polarizada mostrou diferentes áreas de dentina (zona translúcida e dentina desmineralizada) nas amostras e dentina reacional foi encontrada em grande parte das lesões cariosas cervicais. Em todas as lesões foram encontradas desmineralizações dentinárias e a zona translúcida foi identificada por sua maior densidade de elétrons e deposição de material mineral intratubular ocluindo os túbulos. Sabendo que o odontoblasto é essencial na formação e deposição de dentina reacional, e que ambos foram vistos no estudo por meio de microscopia de luz polarizada e elétrons retrodispersos (BSE) foi descartada a hipótese de que a radiação compromete o metabolismo dos odontoblastos e, portanto, mesmo após o tratamento radioterápico, o complexo dentina-polpa mantém sua capacidade de resposta contra agressões, como a cárie.

Em 2010, Konjhodzic-prcic *et al.* realizaram um estudo na Bósnia, em que analisaram trinta pacientes com diagnóstico de doença maligna de cabeça e pescoço. Todos os pacientes foram tratados com radioterapia na região de cabeça e pescoço e foram examinados em quatro períodos diferentes: antes do início do tratamento, 3 semanas após o início do tratamento, 3 meses e 6 meses após o início da radioterapia. Avaliou-se o CPO-D (dentes cariados, perdidos e obturados) médio antes do início da radioterapia, que foi 19,4. Após 3 semanas, o CPO-D permaneceu o mesmo, e três meses após, o CPO-D passou a ser 19,8, enquanto que 6 meses após, o CPO-D foi de 23,9. Esses resultados evidenciaram que a cárie de radiação pode acometer o paciente mesmo que tardiamente, e causa grandes impactos na qualidade de vida, seja durante ou após o tratamento.

Gonçalves *et al.* em 2012 realizaram um estudo em que avaliou, *in vitro*, os efeitos da irradiação com cobalto-60 nas propriedades mecânicas, morfológicas e químicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes, através da microdureza longitudinal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios (EDS). A microdureza do esmalte e da dentina foi avaliada antes e a cada 10 Gy de irradiação, até uma dose cumulativa de 60 Gy. Os dados foram analisados por meio de análise de duas variâncias e teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A morfologia do esmalte e da dentina foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em uma análise semi-quantitativa. Os dados foram analisados usando Kruskal-Wallis e Dunn's ou teste exato de Fisher ao nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a irradiação dos dentes não influenciou a microdureza do esmalte, como um todo, enquanto que, na dentina, verificou-se uma diminuição da microdureza. Com o aumento das doses de irradiação, perceberam-se alterações progressivas nas estruturas do esmalte e da dentina, com uma porção interprismática mais evidente, presença de fissuras e obliterações dos túbulos dentinários e uma fragmentação progressiva das fibras colágenas.

Reed *et al.* em 2015, realizaram um estudo para entender a relação de lesões cariosas induzidas pela radioterapia, avaliando as propriedades nanomecânicas e químicas do esmalte e da dentina e sua composição química. Secções destes terceiros molares foram expostos a 2 Gy, 5 dias por

semana, durante 7 semanas totalizando em 70 Gy no final. Utilizou-se a nonoindentação para avaliar o módulo de elasticidade, e microespectroscopia Raman para avaliar as propriedades químicas. O módulo de elasticidade do esmalte e dentina foi aumentado durante a radioterapia, e de acordo com a microespectroscopia Raman houve uma redução da proteína em relação ao mineral dental. Os autores concluíram que após a radioterapia houve mudanças significativas no elemento dental.

Franzel *et al.*, em 2006, realizaram um estudo em que investigou-se os efeitos da irradiação na desmineralização e remineralização do tecido dental. Foram coletados terceiros molares, que foram preparados e atribuídos ao grupos teste, o qual foi exposto à radiação até 60 Gy, e um grupo controle não irradiado. Os dentes irradiados e não-irradiados foram desmineralizados, e depois remineralizados. A técnica de nanoindentação foi utilizada para medir as propriedades mecânicas, dureza e elasticidade dos dentes em cada uma das condições. Os resultados apontaram que a irradiação diminuiu dramaticamente os parâmetros mecânicos do esmalte e da dentina. Nos dentes irradiados, os efeitos da desmineralização foram insignificantes em comparação aos dentes não irradiados, porém a remineralização levou a uma melhoria parcial das propriedades mecânicas dos dentes.

Deng *et al.* em 2015 mostraram em seu estudo que a prevalência de doenças dentárias parece aumentar significativamente ao longo do tempo de tratamento radioterápico. Realizaram um estudo retrospectivo em pacientes com câncer nasofaríngeo, e os resultados mostraram que as doenças dentárias aumentaram de 16% no primeiro ano pós-irradiação para 36%, 55% e 74% às 3, 5 e 7 anos após o tratamento, respectivamente. Um dos fatores envolvidos ao surgimento da cárie relacionada a radiação foi a diminuição da salivagem consequente do tratamento, que favorece a proliferação de bactérias cariogênicas. Além do mais, a radioterapia pode exercer efeitos diretos na estrutura de esmalte e dentina, incluindo alterações na microdureza e alterações morfológicas em esmalte e dentina, bem como mudanças na composição química de ambos.

Gupta *et al.* em 2015 realizaram uma revisão de literatura a cerca da cárie relacionada a radiação. Foi apontado que a radiação causa disfunção nas glândulas salivares e consequente hipossalivação, o que aumenta o risco de

cárie, uma vez que os tecidos dentais ficam mais susceptíveis a desmineralização. A radiação altera a composição da saliva, diminuindo sua viscosidade, capacidade tamponante e gerando mudanças na concentração de eletrólitos e sistema antibacteriano nela presente, além do pH reduzir de 7 para 5, o que favorece processos cariogênicos. Dessa forma, a remineralização dos tecidos dentais não ocorre devidamente e os pacientes radioterápicos ficam sujeitos ao processo de desmineralização. Acompanhado desse processo, há uma mudança na flora bacteriana bucal desses pacientes aumentando as espécies acidogênicas e cariogênicas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e *Candida* sp.

## **II. Obtenção, seleção e armazenamento dos dentes**

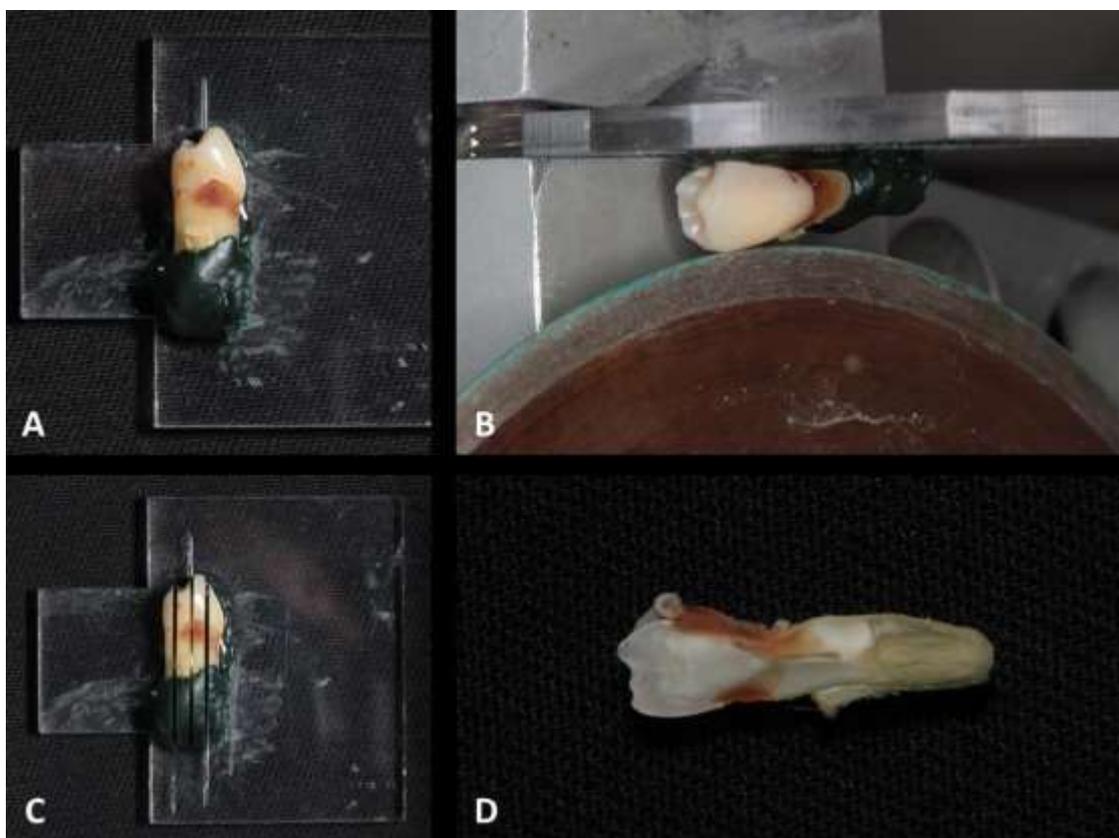
Após aprovação no comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia, sob número de protocolo 50329715.6.0000.5152, foram coletados nas Clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia e do Programa de Cuidados Especiais a Doenças Estomatológicas (PROCEDE - UFU) 10 pré-molares humanos cariados, sendo 5 dentes de pacientes que não receberam tratamento radioterápico, e outros 5 provenientes de pacientes que fizeram radioterapia na região de cabeça e pescoço. Todos os dentes possuíam indicação clínica de exodontia e prévio consentimento dos pacientes que estiveram cientes do uso nesta pesquisa.

Após a coleta, os dentes foram mantidos em água deionizada. Em seguida, os dentes foram limpos com curetas periodontais para a remoção de eventuais restos orgânicos e cálculo. Os dentes foram radiografados para constatação de lesões cariosas que atingiam a dentina e verificação da sua extensão. Foram selecionados aqueles que tiveram lesão com extensão de pelo menos metade da distância da superfície externa do esmalte até a câmara pulpar (Toledano et al., 2015). Os dentes foram armazenados em água deionizada a temperatura de 4°C, até três meses após a exodontia.

Os dentes foram divididos em dois grupos (n=5): grupo não irradiado; e grupo irradiado. Dessa forma, foi possível analisar a dentina cariada e sadia tanto do grupo não irradiado quanto do grupo irradiado.

### **III- Preparo dos dentes**

Os dentes selecionados foram inicialmente seccionados no sentido oclusal-apical através das lesões cariosas usando um disco de diamante em baixa velocidade adaptado em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA. Em cada hemisseção, uma nova secção paralela a primeira foi realizada, a fim de se obter uma fatia final de 2mm.



**Figura 1** - Sequência do preparo das amostras. A - Dente fixado em placa de acrílico com godiva. B – Dente sendo seccionado ao longo eixo da lesão de cárie por disco diamantado; C – Fatias geradas do seccionamento do dente; D – Fatia destinada as análises metodológicas.

Todas as amostras possuíam metade da área da secção transversal sendo dentina aparentemente normal sob uma lupa estereoscópica. Uma hemisseção da coroa foi destinada a análise pelo FTIR e a outra hemisseção foi destinada a análise química por meio do EDS.

#### IV- Síntese Metodológica

##### FTIR- ATR

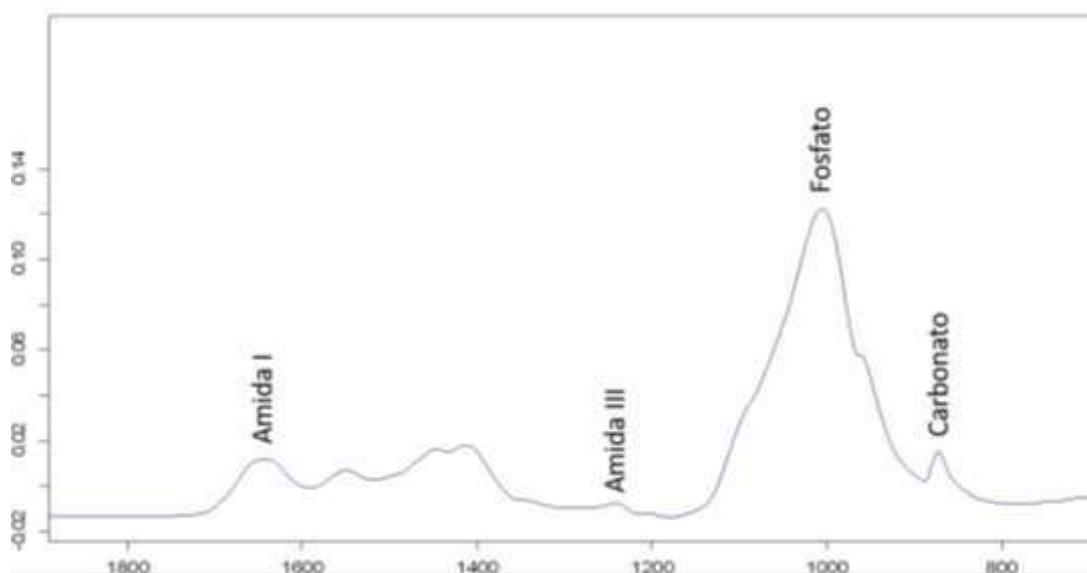
A composição química das amostras de dentina foi determinada utilizando Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha) por meio da técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR) (Figura 2). A superfície testada foi posicionada em contato com o cristal de diamante da unidade ATR e pressionada constantemente por uma garra para aumentar o contato da amostra com o cristal do equipamento (Figura 3). Em seguida, os espectros foram registrados no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Cada amostra foi escaneada 32 vezes e o espectro final obtido é a média de todas essas leituras. Os espectros foram registrados e analisados com o *software* OPUS 6,5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha) (Figura 4). Após correção da linha de base e normalização pela banda do fosfato (702-1190  $\text{cm}^{-1}$ ) dos espectros, os seguintes parâmetros químicos foram analisados: (1) Razão fosfato/amida I, dada pela razão entre as bandas em 1035 e 1655  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à vibração  $\nu_3$  do íon fosfato e ao alongamento C=O da amida I no colágeno, respectivamente; (2) Razão carbonato/mineral, dada pela relação das áreas integradas do carbonato  $\nu_2$  a 872  $\text{cm}^{-1}$  para o fosfato  $\nu_3$  a 1035  $\text{cm}^{-1}$ ; (3) Razão amida I/amida III, indicada pela relação das áreas integradas da amida I a 1655  $\text{cm}^{-1}$  para a amida III a 1235  $\text{cm}^{-1}$  (Jiang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2019).



**Figura 2** - Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier, com dispositivo ATR (Vertex 70, Bruker).



**Figura 3** - Amostra posicionada sobre o cristal do equipamento para leitura.



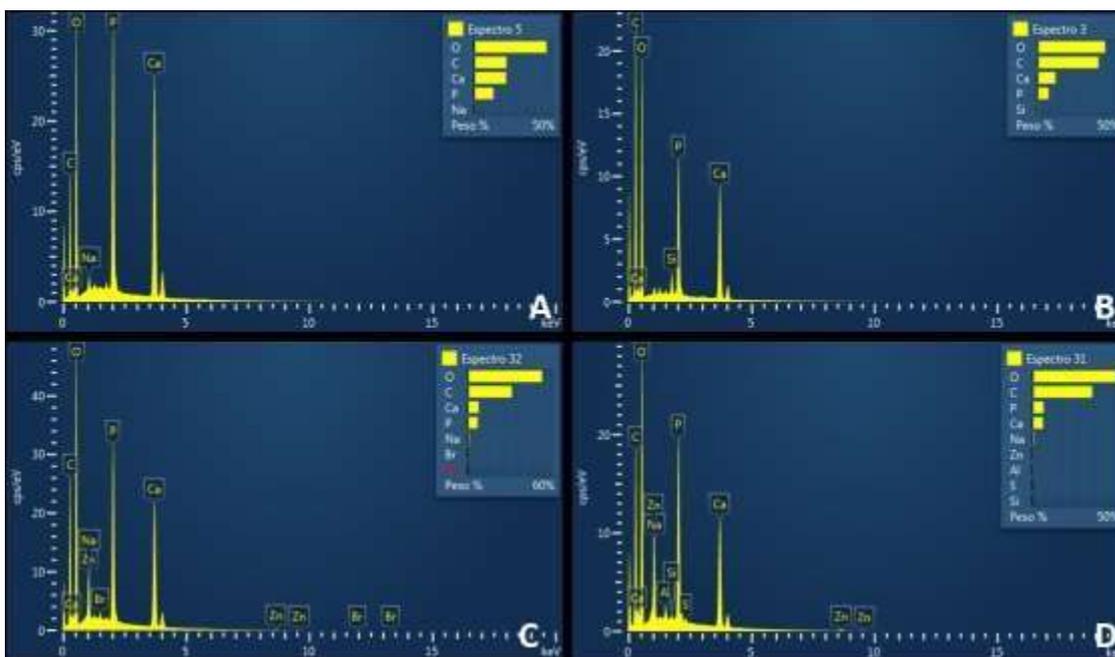
**Figura 4** - Espectro de dentina sadia obtida por meio do *software* OPUS 6.5.

## EDS

Uma análise elementar semi-quantitativa de cálcio (Ca) e fósforo (P) foi realizada utilizando um espectrômetro EDS (X-act, Oxford Instruments) equipado com um tubo de raio X de ródio e um detector de semicondutores arrefecido por nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) (Figura 5). A tensão no tubo foi ajustada para 15 kV.

As medições foram realizadas sob parâmetros básicos para emissão de raios X que são características dos elementos Ca e P, e os elementos O<sub>2</sub> e

H foram utilizados para o equilíbrio químico. Foram coletados três espectros na região da dentina sadia e três espectros na região da dentina cariada (Figura 5) por amostra. A média das concentrações (wT) de Ca e P para obter a razão Ca/P dos três espectros foi calculada por amostra.



**Figura 5** – Espectros obtidos por meio do EDS. Espectros de dentina sadia e cariada do grupo não irradiado (A e B) e do grupo irradiado (C e D), respectivamente.

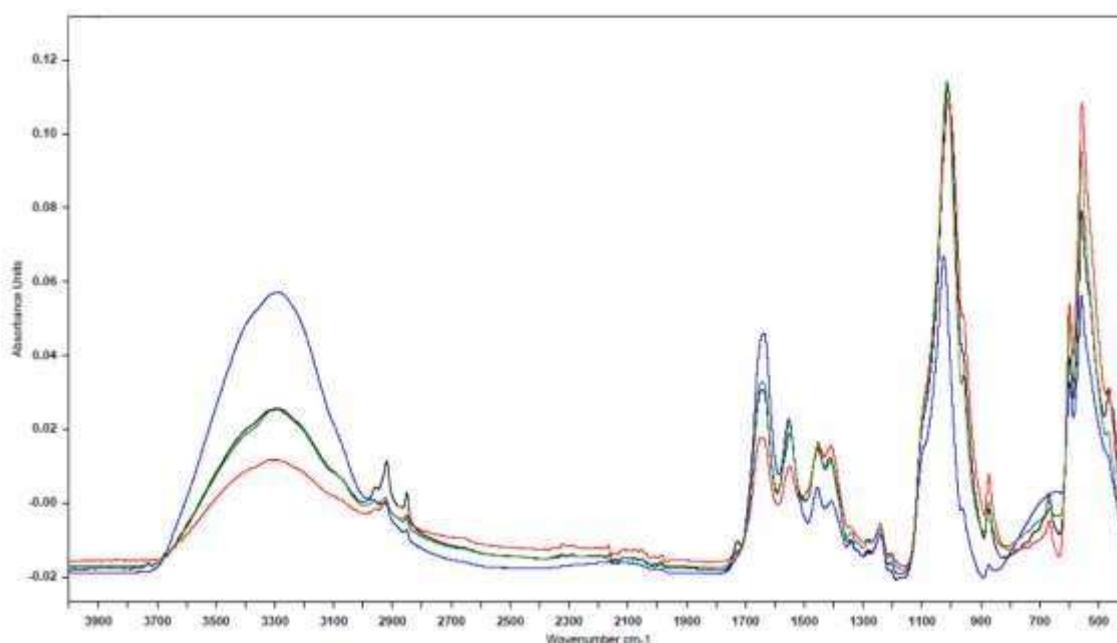
## V- *Análise Estatística*

Os dados de FTIR-ATR e EDS foram avaliados quanto à distribuição normal (Shapiro-Wilk) e teste de igualdade de variâncias (teste de Levene), seguido de testes estatísticos paramétricos. Foi realizada análise de variância ANOVA Two-Way, considerando os fatores de estudo radiação (não irradiado e irradiado) e tipo de dentina (sadia e cariada), seguido por teste de Tukey. O pacote estatístico SigmaPlot® Sistema versão 12.0 (Systat Institute Inc., de San Jose, CA, EUA) foi utilizado para análise e um nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

### FTIR

Os espectros para os grupos estudados são mostrados na Figura 7. Os valores médios e desvio padrão para os modos vibracionais e parâmetros químicos obtidos pelo FTIR-ATR são mostrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Para a razão fosfato/amida I, ANOVA Two-Way mostrou significância estatística para a radiação ( $p=0,012$ ) e cárie ( $p<0,001$ ). Menores valores da razão foram encontrados para dentina afetada por cárie e irradiada. Para a razão carbonato/mineral, apenas a interação entre os fatores de estudo foi significativa ( $p=0,035$ ). O teste de Tukey revelou valores maiores da razão carbonato/mineral para o grupo irradiado e houve menores valores para dentina sadia e para dentina afetada por cárie no grupo irradiado. A razão amida I/amida III mostrou diferença significativa apenas para a cárie ( $p=0,005$ ). A dentina afetada por cárie mostrou maiores valores do que a dentina sadia.



**Figura 6-** Absorvância dos espectros para dentina sadia (linha verde), dentina afetada por cárie não irradiada (linha preta), dentina sadia irradiada (linha vermelha) e dentina afetada por cárie irradiada (linha azul)

**Tabela 1- Média e desvio padrão dos modos vibracionais orgânicos e inorgânicos nos grupos experimentais analisados no FTIR-ATR.**

	Amida I		Fosfato $\nu_{1,3}$		Amida III		Carbonato $\nu_2$	
	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie
Não irradiado	1.30 (0.2)	2.11 (0.5)	13.04 (1.6)	11.27 (2.8)	0.21 (0.0)	0.33 (0.1)	0.25 (0.0)	0.21 (0.0)
Irradiado	1.88 (0.7)	2.85 (0.2)	12.61 (1.5)	8.44 (1.1)	0.29 (0.1)	0.35 (0.1)	0.16 (0.0)	0.06 (0.0)

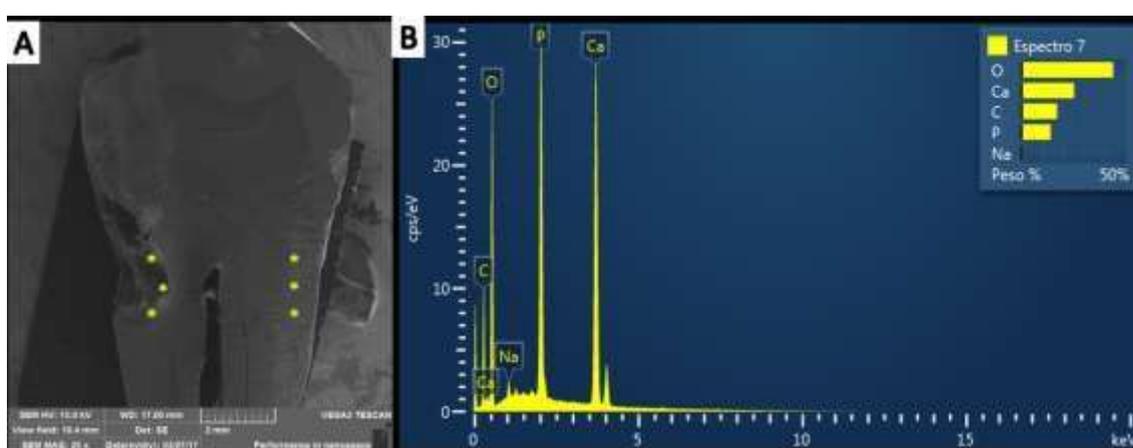
**Tabela 2- Média e desvio padrão para as razões Fosfato/Amida I, Carbonato/Mineral e Amida I/Amida III para os grupos experimentais do FTIR**

	Fosfato/Amida I		Carbonato/Mineral		Amida I/Amida III	
	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie
Não irradiado	10.18 (1.3) Aa	5.84 (2.7) Ab	0.015 (0.01) Aa	0.015 (0.01) Aa	6.38 (1.17) Ab	7.71 (1.29) Aa
Irradiado	7.40 (2.7) Ba	2.99 (0.5) Bb	0.013 (0.00) Ba	0.008 (0.00) Bb	5.76 (1.65) Ab	8.87 (2.65) Aa

\*Grupos identificados com letras maiúsculas diferentes (análise em colunas) e letras minúsculas diferentes (análise em linhas) representam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ).

## EDS

Uma imagem representativa do FESEM-EDS (Field Emission Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) das regiões em que os três espectros foram coletados da dentina afetada por cárie é apresentada na Figura 7-A, bem como um espectro representativo de dentina no EDS (Figura 7-B). A análise do EDS revelou quantidades significativas dos elementos químicos Ca, P, C e O na superfície da dentina. Outros, como F, Si, Na e Mg, apareceram como oligoelementos (<1%) e não apareceram em todas as amostras. Os resultados de Ca, P e da relação Ca/P para dentina sadia e afetada por cárie são apresentados na tabela 3. ANOVA Two-Way revelou uma interação significativa para os valores de Ca e P ( $p=0,036$  e  $p=0,020$ , respectivamente), entre os fatores estudados (irradiação e cárie), com dentina sadia não irradiada apresentando maiores valores de Ca e P do que a dentina afetada por cárie não irradiada. Para os valores da razão Ca/P, ANOVA Two-Way revelou uma diferença significativa para a irradiação ( $p=0,01$ ). Entretanto, o fator cárie ( $p=0,252$ ) e a interação entre os fatores não foram significantes ( $p=0,445$ ). Valores menores da razão Ca/P foram registrados para a dentina irradiada em comparação com a dentina não irradiada. Embora não sejam estatisticamente significativos, foram encontrados valores menores para a razão Ca/P na dentina afetada por cárie nos dois grupos.



**Figura 7-** Imagem ilustrativa do FESEM das regiões em que os três espectros foram coletados em dentina sadia e dentina afetada por cárie (A) e um espectro representativo de dentina no EDS (B)

**Tabela 3- Média e desvio padrão de Ca, P e razão Ca/P analisados no EDS**

	Ca		P		Ca/P	
	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie	Dentina Sadia	Dentina afetada por cárie
Não irradiado	17.1 (5.0) Aa	12.7 (3.6) Ab	10.7 (2.0) Aa	8.13 (1.8) Ab	1.6 (0.2) Aa	1.5 (0.2) Aa
Irradiado	11.4 (5.7) Aa	9.67 (7.5) Aa	8.27 (2.6) Aa	7.11 (3.4) Aa	1.2 (0.2) Ba	1.1 (0.1) Ba

\*Grupos identificados com letras maiúsculas diferentes (análise em colunas) e letras minúsculas diferentes (análise em linhas) representam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A cárie relacionada à radiação apresentou um padrão químico diferente da cárie comum, portanto a hipótese nula foi descartada. Sabe-se que a doença cárie promove uma desmineralização da estrutura dentária por meio de ácidos, especialmente o ácido lático, produzido pela fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta, geralmente a sacarose. A baixa do pH ocasiona dissolução do esmalte e da dentina e transporte do cálcio e fosfato para o meio ambiente bucal (Pinto, 2000).

Para a execução deste estudo, no grupo de dentes irradiados, optou-se pelo uso de dentes que foram irradiados *in vivo*, com o intuito de verificar a influência da radiação sobre as estruturas dentárias associada a fatores relacionados ao ambiente oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante e após a radioterapia, como hipossalivação, baixo pH da saliva, capacidade de tamponamento e dieta que podem influenciar negativamente no desenvolvimento da doença cárie (Lieshout & Bots, 2014; Jawad et al., 2015). Todos os dentes selecionados estavam localizados dentro do campo de irradiação cujos pacientes receberam 72 Gy no total, fracionados em 1,8 Gy diários. Sabe-se que à medida que se aumenta a dose de radiação aumentam-se também as sequelas orais do tratamento do câncer (Gonçalves et al., 2012; Mellara et al., 2014; Liang et al., 2016). Existem dois fatores importantes que promovem a destruição do esmalte e da dentina: a destruição pela radiação e pela radioxerostomia (Franzel *et al.*, 2006).

As metodologias utilizadas neste estudo permitem analisar informações sobre a composição química da dentina (Bistey et al., 2007). A espectroscopia FTIR é a medida do comprimento de onda e da intensidade da absorção de luz infravermelha por uma amostra, permitindo analisar a composição química do tecido dental por meio de vibrações moleculares (Lopes et al., 2018). A luz infravermelha é energética o suficiente para excitar vibrações moleculares a níveis de energia mais elevados (Cui et al., 2012; Lopes et al., 2018). E a espectroscopia por energia dispersiva de raios-x é uma técnica analítica usada para a análise elementar ou caracterização química de uma amostra. É uma das variantes da espectroscopia por fluorescência de raio X que se baseia na investigação de uma amostra através de interações entre partículas ou radiação

eletromagnética e matéria, analisando os raios X emitidos pela matéria em resposta à incidência de partículas carregadas. Sua capacidade de caracterização é devida em grande parte ao princípio fundamental que cada elemento tem uma estrutura atômica única, de modo que os raios X emitidos são característicos desta estrutura, que identificam o elemento (Toledano *et al.*, 2015).

Sabe-se que determinados meios de armazenamento poderiam incorporar novos íons e componentes químicos às amostras, então optou-se por utilizar a água deionizada para o armazenamento das amostras, uma vez que ela passa por um processo de purificação no qual é feita a remoção total de íons, além de minerais, metais e outros contaminantes (Jiang *et al.*, 2007).

A dentina apresenta características diferentes após o tratamento de radioterapia, comparada a uma dentina não irradiada (Soares *et al.*, 2010). Ao observar a porção inorgânica da dentina pelo FTIR, são encontradas alterações nas bandas de fosfato e carbonato promovidas pela cárie relacionada à radiação, e conseqüentemente na razão carbonato/mineral. Os menores valores na concentração dos íons fosfato e carbonato podem estar relacionados por um maior número de íons de carbonato substituindo os íons de fosfato na estrutura da hidroxiapatita, alterando a estrutura cristalina da hidroxiapatita que forma a dentina (Featherstone & Lussi, 2006; Leventouri *et al.*, 2009; Shellis *et al.*, 2014). Dois tipos de substituição podem ocorrer, tipo A e tipo B, em que o primeiro é designado pelos íons carbonato substituindo as posições dos hidróxidos enquanto que o último quando o carbonato ocupa as posições dos íons fosfato (Rey *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2014). Essa substituição causa deformações na rede cristalina e resulta em fases menos estáveis e mais solúveis em ácido, o que poderia justificar o padrão mais agressivo da cárie relacionada à radiação em relação à cárie comum.

Entende-se que a baixa do pH salivar ocasiona dissolução dos cristais de hidroxiapatita do esmalte e da dentina e transporte do cálcio e fosfato para o meio ambiente bucal (Pinto, 2000). Desta forma, é justificável encontrar uma menor razão para Ca/P para regiões de dentina cariada em relação a regiões de dentina sadia. E esse fenômeno só foi detectável pelo EDS nos dentes irradiados, mais uma vez justificando a forma mais agressiva da cárie relacionada à radiação.

Ao analisar a porção orgânica, pode-se afirmar que a cárie expôs a matriz orgânica da dentina, devido à desmineralização. Foram percebidos maiores valores de amida I e conseqüentemente menores valores da razão fosfato/amida I para ambos os grupos, irradiado e não irradiado. A amida I é a banda de absorção mais intensa nas proteínas e é regida primariamente pelas vibrações de estiramento dos grupos C=O (70-85%) e C-N (10- 20%). A posição exata da banda é determinada pela conformação da estrutura e pelo padrão de ligação do hidrogênio (Xu & Wang, 2012). No grupo irradiado, tivemos ainda maiores valores da razão Amida I/Amida III, justificável também por esses maiores valores da amida I.

Com base nos resultados deste estudo, pode-se afirmar que a cárie altera a composição química da dentina, contudo a cárie relacionada à radiação se mostrou mais agressiva que a cárie comum. E que esta não é efeito apenas das alterações na composição salivar, dietética ou microbiológica, mas também devido às mudanças na estrutura dentária dos pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço. As taxas de sobrevivência crescentes destes pacientes mostram, portanto, que a prevenção e o tratamento dos efeitos colaterais da radioterapia se tornam uma questão prioritária para as próximas pesquisas, buscando devolver qualidade de vida a esses pacientes.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste estudo, foi possível concluir que a cárie altera a composição química da dentina, sendo que a radiação faz com que essa mudança aconteça de forma mais acentuada. A cárie relacionada à radiação modificou a troca de íons fosfato-carbonato na hidroxiapatita, aumentou a detecção do componente orgânico amida I na dentina e alterou o conteúdo inorgânico de cálcio e fosfato. Tais alterações caracterizam uma cárie de dentina mais agressiva de pacientes que realizam radioterapia na região de cabeça e pescoço.

**AGRADECIMENTOS**

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de iniciação científica CNPQ2016-SAU016. Ao CPBIO, onde grande parte dos estudos foi realizada, e ao Laboratório Multiusuário de Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia por fornecer o equipamento e suporte técnico para experiências envolvendo o detector de energia dispersiva de raios-x.

## REFERÊNCIAS

Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. **Dental management of patients irradiated for head and neck cancer.** Aust Dent J, 2014; 59: 20–28.

Beumer J, Curtis THA, Marunick MT. **Maxillofacial rehabilitation, prosthodontic and surgical considerations, 1st edn.** Medico Dental Media International, 1996, pp. 43–71.

Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. **In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel.** J Dent, 2007; 35(4):325-30.

Cacelli EMN, Rapoport A. **Para-efeito das irradiações nas neoplasias de boca e orofaringe.** Rev. Brás. Cir. Cabeça e Pescoço, 2008. v.37, nº 4, p.198-201.

**Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** 2 ed. rev. atual. - Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993.

Cui Y, Fung KH, Xu J, Ma H, Jin Y, He S, et al. **Ultrabroadband light absorption by a sawtooth anisotropic metamaterial slab.** Nano Lett., 2012. 12(3):1443-7.

Denham JW, Peters LJ, Johansen J, Poulsen M, Lamb DS, Hindley A, et al. **Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer?** Radiother Oncol. 1999. 52(2):157-64

Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. **Dental desmineralization and caries in patients with head and neck cancer.** Oral Oncology 51, 2015. p.824–831

Featherstone JD, Lussi A. **Understanding the chemistry of dental erosion.** Monogr Oral Sci., 2006. 20:66-76.

Franzel W, Gerlach R, et al. **Effect of tumor therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue.** Z Med Phys, 2006. 16:148–154.

Galvao-Moreira LV, Da Cruz MC. **Dental demineralization, radiation caries and oral microbiota in patients with head and neck cancer.** Oral Oncol, 2015. v. 51, n. 12, p. e89-90.

Gonçalves, LMN. **Efeito da radioterapia sobre as propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes – estudo in vitro.** Universidade de São Paulo, 2012.

Gupta N, Pal M, Rawat S et al. **Radiation-induced dental caries, prevention and treatment – A systematic review.** Natl J Maxillofac Surg., 2015. 6(2): 160–166.

Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. **Effects of Hydrogen Peroxide on Human Dentin Structure.** Journal of Dental Research, 2007. Vol 86(11), pp. 1040-1045

Jawad H, Hodson NA, Nixon PJ. **A review of dental treatment of head and neck cancer patients, before, during and after radiotherapy: part 1.** Br Dent J. 2015; 218(2):65-8.

Jham BC, Freire ARS. **Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço.** Rev. Bras. Otorrinolaringol, São Paulo, 2006. vol.72 no.5

Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. **Radiat-relat Damage Dentition.** Lancet Oncol, 2006. 7:326–335.

Konjhodžić-PRCI A, et al. **Incidence of Radiation Caries in Patients Undergoing Radiation Therapy in the Head and Neck Region.** Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, 2010. 10(3):489-492.

Leventouri TH, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. **Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age.** Int J Biomater. 2009. doi:10.1155/2009/698547

Liang X, Zhang JY, Cheng IK, Li JK. **Effect of high X-ray irradiation on the nano-mechanical properties of human enamel and dentine.** Braz Oral Res. 2016. 30:e9. doi:10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0009.

Lieshout HF, Bots CP. **The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review.** Clin Oral Invest. 2014. 18(1):17-24

Liu Y, Dang Z, Wang Y, Huang J, Li H. **Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: Inherited nanostructures and enhanced properties.** Carbon 67, 2014. p.250 – 259

Lopes CCA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. **Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone.** Appl Spectrosc Rev. 2018;53:747-69. doi: 10.1080/05704928.2018. 1431923

Miranda RR, Silva ACA, Dantas NO, Soares CJ, Novais VR. **Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman Spectroscopy.** Clin Oral Investig. 2019; 23(8):3351-3358

Mellara TS, Palma-Dibb RG, Oliveira HF, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva RAB, et al. **The effect of radiation therapy on the mechanical and morphological properties of the enamel and dentin of deciduous teeth – an in vitro study.** Radiat Oncol. 2014. 9(30):1-7.

Notani K, Yamazaki Y, Kitada H, Sakakibara N, Fukuda H, Omori K, Nakamura M. **Management of mandibular osteoradionecrosis corresponding to the severity of osteoradionecrosis and the method of radiotherapy.** Head Neck. 2003. 25(3):181-6.

Otmani N. **Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children.** J Can Dent Assoc. 2007. 73(3):257-61.

Pakravan F, Ghalayani P, Emami H, Isfahani MN, Noorshargh P. **A novel formulation for radiotherapy-induced oral mucositis: Triamcinolone**

**acetonide mucoadhesive film.** J Res Med Sci 2019. p. 24:63.

Pinto, VG. **Saúde Bucal Coletiva.** Santos: Editora Santos. 2000. p. 720

Reed R, Xu C, Liu Y, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. **Radiotherapy effect on nano- mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine.** Archives of oral biology 60, 2015. 690 – 697

Rodrigues RB, Soares CJ, Simamoto Junior PC, Lara VC, Arana-Chaves VE, Novais VR. **Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strenght.** Clin Oral Invest. 2018;22(2):875–83.

Rolim AEH, Costa LJ, Ramalho LMP. **Repercussões da radioterapia na região orofacial e seu tratamento.** Radiol Bras. São Paulo, 2011. vol.44 no.6

Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. **Understanding the chemistry of dental erosion.** Monogr Oral Sci. 2014. 25:163-79.

Silva ARS, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. **Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries.** Caries Res, 2009. 43:43–49

Spetch L. **Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of the problem.** Supp Care Dent., 2002. 10: 36-9.

Soares CJ, Neiva NA, Soares PBF, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, Marques MR. **Effects of Chlorhexidine and Fluoride on Irradiated Enamel and Dentin.** J Dent Res, 2011. 90: 659

Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PCF, Naves LZ and PEREIRA PNR. **Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin.** J Dent Res 2010, 89(2):159-64.

Takahashi N, Nyvad B. **The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives.** J Dent Res. 2011. 90(3):294-303.

Thomson WM. **Measuring change in dry-mouth symptoms over time using the Xerostomia Inventory.** Gerodontology. 2007. 24(1):30-5.

Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. **Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn- doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model.** J Mech Behav Biomed Mater, 2015. 50:131-49.

Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. **Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy.** Crit Rev Oral Biol Med. 2003. 14(3):213-225.

Wefel JS. **Effects of fluoride on caries development and progression using intra- oral models.** J Dent Res, 1990. 626-636.

Walker MP, Wichman B, et al. **Impact of Radiotherapy Dose on Dentition Breakdown in Head and Neck Cancer Patients.** Pract Radiat Oncol. 2011. 1(3): 142–148.

Xu C, Wang Y. **Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited.** Arch Oral Biol. 2012. 57(4):383-91

Yamauchi M, Sricholpech M. **Lysine post-translational modifications of collagen.** Essays Biochem., 2012. 52:113-33.