



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

“TIMIMG” NA APLICAÇÃO DE UM COLUTÓRIO À BASE DE FLÚOR NO ESMALTE ERODIDO

Trabalho submetido por
Mariana Matias Gonçalves
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

“TIMIMG” NA APLICAÇÃO DE UM COLUTÓRIO À BASE DE FLÚOR NO ESMALTE ERODIDO

Trabalho submetido por

Mariana Matias Gonçalves

para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Ana Cristina Manso

e coorientado por

Prof. Doutora Carla Ascenso e

Mestre Joana do Carmo

outubro de 2016

Aos meus pais e
Ao meu irmão,
Que ajudam a construir
Todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Ana Cristina Manso, pela disponibilidade e acompanhamento, por todo o incentivo, e, principalmente, por ter motivado o meu interesse pela Medicina Dentária, mostrando-me que, com empenho, o sucesso é sempre alcançável.

À Prof. Doutora Carla Ascenso, pela sua coorientação, acompanhamento, e pela motivação e força de vontade em aprender cada vez mais que sempre me transmitiu.

À minha coorientadora, Mestre Joana do Carmo, por todos os conselhos, pelo tempo disponível e por sempre ter mostrado a sua boa disposição ao longo deste processo.

À Eng^a Isabel Nogueira, do IST-UL pela sua disponibilidade e simpatia, existente aquando da exploração de imagens na MEV.

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, por todos os materiais disponibilizados e pelos cinco anos que me proporcionou, tanto a nível profissional como pessoal.

Aos meus pais, que me permitiram sonhar cada vez mais alto e me ajudam todos os dias a perseguir os meus sonhos. A eles agradeço profundamente todo o apoio, união e carinho, seja neste projeto, nos últimos cinco anos, ou em toda a minha vida.

Ao meu irmão e melhor amigo, Bernardo, por toda a paciência, motivação, e por me ter ajudado a crescer e a ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu avô Luís, por me ter transmitido a força e a garra necessárias para este projeto. E a toda a minha família por ser a melhor que poderia ter e por me ajudar e apoiar em todos os momentos.

Às minhas amigas que são como irmãs, Maria Patrocínio, Filipa Romão, Catarina Oliveira, por toda a amizade, carinho, e por acreditarem sempre em mim. E à minha parceira de box, Teresa Carvalho, por todas as aventuras ao longo destes cinco anos e por todo o apoio e amizade que irão permanecer para sempre.

A todos os meus queridos amigos que me apoiaram.

RESUMO

Objetivos: Aplicar um colutório à base de flúor no esmalte erodido, em distintos “timings” de aplicação, comparando a sua microdureza e analisando microscopicamente a sua superfície.

Materiais e Métodos: 48 espécimes de esmalte humano (4x3 mm), intactos, livres de cáries e fraturas, foram selecionados aleatoriamente e divididos em quatro grupos: três grupos (A-C), submetidos a um desafio erosivo com Redbull®, de 20 minutos/3xdia, com um intervalo de 2 horas e 40 minutos, durante 7 dias seguidos; um grupo (D) de controlo, de esmalte são. Aos grupos A-C foi aplicado um colutório de fluoreto de estanho e fluoreto de amina (Meridol®) em diferentes tempos: grupo A, “*timing*-antes” do desafio erosivo; grupo B, “*timing*-depois”; grupo C, “*timing* antes e depois”. A cada 10 espécimes foi medida a dureza Vickers. A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa IBM® SPSS® Statistics versão 24 (teste ANOVA a um fator com um IC de 95% e teste post-hoc de Games-Howell). 2 espécimes de cada grupo foram submetidos a uma análise qualitativa da superfície do esmalte por microscopia eletrónica de varrimento.

Resultados: Os valores médios obtidos para cada grupo (Grupo A - 441,98±9,08 HV; Grupo B - 320,52±13,82 HV; Grupo C - 469,85±17,98 HV; Grupo D - 357,58±23,72 HV) revelaram um aumento da microdureza quando o colutório foi aplicado “antes e depois” do desafio erosivo e, também, antes desse desafio, em comparação com o esmalte são. Observaram-se, nos grupos A e C, regiões uniformes que correspondem a matéria orgânica interprismática. No grupo B, foi notória a desorganização na orientação dos prismas de esmalte.

Conclusões: A aplicação do colutório Meridol® teve como momento mais favorável o “*timing* antes e depois”. As imagens obtidas através da microscopia electrónica de varrimento são compatíveis com os resultados da microdureza.

Palavras-chave: Erosão, remineralização, fluoreto de estanho, fluoreto de amina

ABSTRACT

Objectives: To apply a fluorine-based mouthrinse on the eroded enamel in different timings of application by comparing its hardness and analysing its surface microscopically.

Materials and Methods: 48 human enamel specimens (4x3 mm), intact, free of cavities and fractures, were randomly selected and divided into four groups: three groups (A-C), subjected to an erosive Redbull® challenge, 20 minutes / 3 times a day with an interval of 2 hours and 40 minutes, for 7 consecutive days; one control group (D), of sound enamel. To the groups A-C it was applied a tin fluoride and amine fluoride mouthrinse (Meridol®) in different timings: group A "before" the erosive challenge; group B "after"; group C, "before and after." The 10 specimens were measured by Vickers hardness test. Statistical analysis was performed using the IBM® SPSS® Statistics version 24 (ANOVA test of a factor with an 95% IC and post-hoc test of Games Howell) program. 2 specimens of each group were subjected to a qualitative analysis of the enamel surface by scanning electron microscopy.

Results: The mean values for each group (Group A - 441.98 ± 9.08 HV Group B - 320.52 ± 13.82 HV; Group C - 469.85 ± 17.98 HV; Group D - 357 , HV 58 ± 23.72) showed an increase in hardness when the mouthrinse was applied "before and after" the erosive challenge and also "before" this challenge, when compared to sound enamel. It was observed in groups A and C, uniform regions with interprismatic organic matter. In group B, it was notorious the disorganization in the orientation of enamel prisms.

Conclusions: Meridol® mouthrinse had the most favourable application time when applied "before and after". The images obtained by scanning electron microscopy are consistent with microhardness results.

Keywords: Erosion, remineralization, tin fluoride, amine fluoride

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE GERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	8
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	15
2. LOCAL DO ESTUDO	15
3. TIPO DE ESTUDO	15
4. SELEÇÃO DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMENES	17
5. ALEATORIZAÇÃO DA AMOSTRA	19
6. INDUÇÃO DA EROÇÃO COM BEBIDA CARBONATADA.....	21
7. APLICAÇÃO DO AGENTE REMINERALIZANTE	23
8. TESTE MICRODUREZA DE VICKERS	25
9. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (MEV)	26
10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
RESULTADOS	31
1. VALORES DE pH.....	31
2. VALORES DE MICRODUREZA DE VICKERS.....	31
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO.....	35
5. RESUMO DAS IMAGENS OBTIDAS POR MEV.....	43
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	51
BIBLIOGRAFIA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do protocolo laboratorial.	16
Figura 2. Cortes exemplificativos dos dentes de estudo: longitudinal – divisão entre vestibular e palatina; transversal – secção coroa/raiz; cortes 3x4 – obtenção dos fragmentos finais.	17
Figura 3. Micrótopo de tecidos duros Accutom-50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) para efetuar todos os cortes dos dentes.....	18
Figura 4. Polidora LaboPol-4 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca).....	19
Figura 5. Bebida energética e carbonatada, RedBull® - agente erosivo.	21
Figura 6. Potenciômetro para medição do pH das soluções.	22
Figura 7. Colutório Meridol® utilizado como agente remineralizante.	23
Figura 8. Agitador magnético Agimatic-N Selecta®	24
Figura 9. Indentador HSV-30® (Shimadzu) utilizado para medir a dureza Vickers (à esquerda) e pormenor da lente em processo de zoom com um fragmento (à direita).	25
Figura 10. Indentações Vickers em esmalte submetido aos desafios erosivo e remineralizante (à esquerda) e em esmalte são, não submetido a nenhum dos desafios (à direita).....	26
Figura 11. Quorum Q150T ES, Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coater, utilizado para desidratar os espécimes em vácuo.	27
Figura 12. Fragmento sobre a fita adesiva de carbono, na base apropriada.	27
Figura 13. Interior da máquina Quorum Q150T ES, com a amostra preparada para ser submetida ao banho de uma liga metálica de ouro-paládio em vácuo.	27
Figura 14. Amostra após banho com uma liga metálica de ouro-paládio; é possível observar a camada metálica que cobre a superfície da amostra.	28
Figura 15. Microscópio JEOL JSM-700001F (à esquerda), onde foram observados os espécimes e (à direita) pormenor do interior onde foram colocados os espécimes para observação em microscopia eletrónica de varrimento.	29
Figura 16. Diagrama de caixa dos valores de microdureza obtidos em cada grupo (N=10).	33
Figura 17. Representação gráfica da média de cada grupo, evidenciando a diferença numérica entre os mesmos, detetada pelo teste de ANOVA a um fator e sugerindo as comparações/contrastes mais relevantes a analisar pelo método das comparações múltiplas.	34

Figura 18. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. É visível a consistência da superfície, apresentando uma imagem uniforme.....	35
Figura 19. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. Observa-se uma organização evidente, sob a forma de “favos de mel”, evidenciando zonas mais profundas e zonas mais remineralizadas.....	35
Figura 20. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. O interior de um “favo de mel”, em que é possível observar o centro do mesmo a uma maior profundidade; a periferia mais remineralizada, evidenciando os depósitos de fluoreto nesta estrutura.....	36
Figura 21. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Nesta imagem é de realçar as zonas de desmineralização evidente, como a zona central, apresentando uma consistência inconstante em toda a sua superfície.	37
Figura 22. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Aproximação às zonas de elevada desmineralização, mais cavidades e profundas, mostrando uma estrutura evidentemente desprotegida.....	37
Figura 23. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Uma imagem que seria de um dos “favos de mel” característicos do esmalte; no entanto observa-se uma estrutura visivelmente desmineralizada, que perdeu a sua forma inicial.	38
Figura 24. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. Observam-se os típicos “favos de mel” mais preenchidos, possivelmente mais remineralizados.	39
Figura 25. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. É evidente a deposição elevada de fluoreto nesta imagem, revelando uma maior capacidade remineralizante e um esmalte mais protegido.	39
Figura 26. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. Quando aproximada a superfície do esmalte, confirmam-se os depósitos de fluoreto. Também é visível uma maior desorganização da estrutura mineral.	40

Figura 27. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. A matéria orgânica interprismática é visível nesta imagem.....	40
Figura 28. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x1000. O esmalte encontra-se visivelmente mineralizado, adquirindo um aspeto semelhante aos “favos de mel”.	41
Figura 29. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x5000. Quando aproximado são perceptíveis as zonas mineralizadas, não erodidas nem submetidas a um desafio erosivo.....	42
Figura 30. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x10000. Encontra-se um “favo de mel” com interior ainda não cavitado nem profundo, embora as zonas mais elevadas de remineralização persistam.....	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores das medições de pH dos agentes remineralizante e erosivo, à temperatura ambiente e em refrigeração.	31
Tabela 2. Média dos valores da microdureza Vickers, em HV, das cinco indentações efetuadas em cada fragmento.	31
Tabela 3. Média dos valores da microdureza Vickers, em MPa, das cinco indentações efetuadas em cada fragmento.	32
Tabela 4. Valores da amostra (N), mostrando que todos os grupos apresentam o mesmo número de medições Vickers.....	32
Tabela 5. Teste de normalidade aplicado a cada grupo, verificando que todas as amostras analisadas (grupos A-D) são normais.....	33
Tabela 6. Tabela descritiva com os valores da média de todos os grupos, inclusive o valor máximo e o mínimo da microdureza dos respectivos grupos.	33
Tabela 7. Imagens comparativas da visão panorâmica da superfície de esmalte dos vários grupos, nas diferentes ampliações observadas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HV – Vickers Hardness

Kps – Constante termodinâmica do produto de solubilidade

MEV – Microscopia Eletrónica de Varrimento

MPa – Mega Pascal

ppm – Partes por milhão

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

% – Percentagem

INTRODUÇÃO

Os dentes, constituídos pelo tecido mais duro do corpo humano, o esmalte dentário, poderiam durar uma vida inteira. Na realidade, existem fatores ambientais orais que protegem e ajudam a manter e a preservar a sua função mastigatória e estética no curso natural da nossa vida. Constata-se clinicamente, no entanto, que a apatite natural, biologicamente produzida no nosso organismo, pode sofrer depleção mineral, na presença de processos patológicos, de origem não cariogénica, como o desgaste dentário de origem erosiva. O esmalte quando sujeito a agentes erosivos sofre uma degradação da sua superfície, provocando alterações irreversíveis na sua dureza, forma, função, estética, podendo conduzir à perda total da sua estrutura (West & Joiner, 2014), afetando a qualidade de vida dos nossos pacientes.

A erosão dentária inicia-se no esmalte, quando este é exposto a um ambiente ácido. Com o aumento do consumo de bebidas ácidas e carbonatadas (como, por exemplo, sumos de fruta, refrigerantes e bebidas energéticas), o desgaste dentário tem sido cada vez mais associado à erosão, por agentes que interagem do ponto de vista químico com o nosso sistema biológico, produzindo alterações bioquímicas significativas. As bebidas carbonatadas possuem um baixo pH, conferindo-lhes uma natureza mais corrosiva, e fazendo com que a frequência da sua ingestão potencie a formação de lesões erosivas. O pH da cavidade oral é, geralmente, cerca de 7,4 - valor que sofre uma diminuição quando ocorre a dissolução do esmalte e da dentina (Loke, Lee, Sander, Mei, & Farella, 2016). A solubilidade do esmalte é pH dependente, e a taxa de precipitação da apatite depende da ligação do cálcio à saliva. O pH crítico do esmalte é cerca de 5,5 e o nível total de ácido (acidez titulável) em bebidas ácidas determina a concentração de iões de hidrogénio disponíveis para interagir e danificar a sua superfície (Trivedi et al., 2015). Clinicamente, é possível observar o efeito da erosão, através da desmineralização da superfície dentária provocada por um agente erosivo (Zheng, Xiao, Qian, & Zhou, 2009).

O esmalte é composto, na sua maioria, por substâncias inorgânicas (92-96%), orgânicas (1-2%) e água (3-4%). As substâncias inorgânicas constituem, a maior parte, os cristais de hidroxiapatite, os quais são dissolvidos pelos compostos ácidos e à qual se chama desmineralização superficial (Zheng et al., 2009). Os cristais de hidroxiapatite (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) têm cerca de 50 nm de largura por 25 nm de espessura e vários micrómetros de comprimento, no entanto, o tamanho desta estrutura cristalina

pode variar conforme a sua profundidade (Li, Wang, Joiner, & Chang, 2014). Quando exposta ao ácido por um prolongado período de tempo, a superfície do esmalte pode amolecer – designando-se este achado na literatura como “softening layer”. Esta camada é removida parcialmente, sofrendo uma abrasão mecânica por forças abrasivas que seriam normais, como a força exercida pela língua ou a escovagem dentária, *per si*, o que não se verifica no esmalte íntegro (Carvalho & Lussi, 2014).

Se a camada mais superficial de esmalte erodido não for remineralizada por um agente remineralizador (como, por exemplo, a saliva) e a erosão pelo ácido persistir, poderá provocar a perda irreversível das respetivas camadas de esmalte. O agente ácido pode ter duas origens distintas: intrínseca, como os ácidos gástricos, que podem atingir os dentes através do vômito, regurgitação, refluxo gastroesofágico ou ruminação; extrínseca, como dietas ácidas, medicamentos erosivos, piscinas com pH inferior ao adequado ou fumos ácidos provenientes de fábricas. Os ácidos intrínsecos podem ser considerados mais erosivos, uma vez que o seu pH (1-1,5) é significativamente inferior ao pH de desmineralização do esmalte (5,5). No entanto, os ácidos extrínsecos afetam a maioria da população através da dieta e, nos dias de hoje, o consumo crescente de bebidas carbonatadas tem uma influência acrescida na erosão dentária (West & Joiner, 2014). As bebidas energéticas representam uma grande parte destas bebidas, sendo definidas como refrigerantes com algumas formas vitamínicas e outras substâncias químicas que aumentam a energia corporal por um certo período de tempo (Pinto et al., 2013). Dentro destas substâncias podemos identificar a cafeína, taurina, suplementos herbais, açúcares e adoçantes, utilizadas para melhorar o desempenho energético, a resistência, a concentração e a performance atlética (Erdemir, Yildiz, Eren, & Ozel, 2012).

Existem outros fatores que influenciam o grau de erosão clinicamente visível, como, por exemplo, os fatores comportamentais. Entre estes, é de realçar a duração e a frequência do consumo das bebidas ácidas e/ou carbonatadas, constando os indivíduos que mantêm os alimentos em contacto com as superfícies dentárias durante um período de tempo mais prolongado que o normal. O consumo de estupefacientes ou álcool em excesso, são exemplos de comportamentos que influenciam a extensão da erosão, sendo aconselhável manter uma dieta equilibrada e saudável, cumprindo as medidas de prevenção e higiene oral diárias (West & Joiner, 2014).

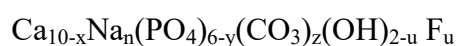
O processo de remineralização ou redução da desmineralização do esmalte é hoje possível devido ao desenvolvimento de inúmeras pesquisas ao longo dos anos,

providenciando uma melhoria das condições da saúde oral (Li et al., 2014). Os minerais necessários são, assim, devolvidos novamente à estrutura molecular do esmalte dentário. Para que este processo ocorra, geralmente, utilizam-se terapias à base de flúor, produzindo a fluorapatite, mais resistente que a hidroxiapatite natural do dente – remineralização artificial (Strnad & Buka, 2014). Neste procedimento, os íons de fluoreto substituem os íons hidróxido da estrutura cristalina. A solubilidade da fluorapatite é inferior à solubilidade da hidroxiapatite, adquirindo maior resistência às substâncias ácidas que afetam o esmalte. Quando aumentadas as forças de ligação entre o flúor e os cristais de apatite, a dureza dos dentes tende a aumentar (Byeon, Lee, & Bae, 2016).

No entanto, em contraste à ideia mencionada anteriormente, existem autores como Cochrane, Cai, Huq, Burrow, & Reynolds (2010), que consideram a solubilidade da fluorapatite (120,3 Ksp) ligeiramente superior à da hidroxiapatite (117,2 Ksp). Apesar das divergências e de ainda não ter sido encontrado um consenso na literatura, a fluorapatite mantém as suas propriedades remineralizantes, sendo claro o seu efeito contra a erosão provocada por substâncias ácidas. São citadas, também, por Alhilou et al. (2016) as suas vantagens, como, por exemplo, uma melhor biocompatibilidade e bioatividade.

Rošin-Grget, Peroš, Šutej, & Bašić (2013), por outro lado, confirmam uma ligeira redução na solubilidade do esmalte dentário, quando submetido à incorporação de flúor nos cristais da sua estrutura. A hidroxiapatite permite a incorporação de vários íons na sua composição, o que afeta diretamente a solubilidade da mesma. No caso do flúor, estes autores mencionam a sua capacidade em reduzir a quantidade de apatite carbonatada – apatite que possui uma maior solubilidade – bem como o seu efeito, quando aplicado em pequenas concentrações e mais frequentemente. O nível de flúor encontrado na superfície do esmalte é visivelmente superior ao da sua subsuperfície, apresentando valores entre os 2000-3000 ppm. Estes valores são, no entanto, insuficientes para provocar uma redução significativa na solubilidade da hidroxiapatite. Assim, a constante termodinâmica do produto de solubilidade (Kps) da fluorapatite é apenas ligeiramente menor do que a da hidroxiapatite.

A estrutura mineral, representada pela norma:



está em equilíbrio quando os respetivos iões Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- , F^- , se encontram em quantidade suficiente, mantendo constante o líquido envolvente. Estes iões são fundamentais à saturação da solução que envolve o dente, e determinam a dissolução dos minerais presentes no esmalte dentário. Em sobressaturação, ocorre a deposição dos minerais na superfície do esmalte, ou, em caso contrário, ocorre a desmineralização da mesma. Este mecanismo consegue, de forma simplificada, explicar como acontece o ataque ácido ao esmalte, no momento da desmineralização: os iões H^+ do ácido aderem à superfície dentária, fazendo com que os iões PO_4^{3-} e OH^- sejam dissolvidos do esmalte, para equilibrar a solução. Neste instante, na presença dos iões, a solução ácida tende a aumentar ligeiramente o seu pH (Lussi & Carvalho, 2015).

Por conseguinte, a aplicação regular de produtos fluoretados tem sido recomendada com o objetivo de reduzir a solubilidade das superfícies dentárias, não obstante o facto da sua eficácia ser variável conforme o composto utilizado em associação com o flúor (F). Os compostos convencionais utilizados, capazes de reverter o efeito da desmineralização nos cristais de hidroxiapatite, são os seguintes: cálcio (CaF_2), sódio (NaF) e amina (AmF), sendo o cálcio relatado como o principal mecanismo de proteção, em forma de depósitos sobre a superfície do esmalte, que atuam como barreira física ou reservatório mineral. Contudo, alguns estudos mostraram que o estanho (Sn) pode possuir uma maior eficácia: os catiões deste metal polivalente, quando associados ao flúor (F), formam o fluoreto de estanho (SnF_2), que, ao interagir com a superfície do esmalte, resulta num revestimento abundante em Sn^- , importante na prevenção da erosão dentária (Scaramucci et al., 2015).

O uso diário de produtos como, por exemplo, os colutórios fluoretados, é uma prática comum, que protege o esmalte formando uma camada de CaF_2 – mecanismo semelhante aos produtos que apresentam na sua composição o estanho, Sn. A vantagem deste ião prende-se com a sua capacidade em criar um revestimento estável e resistente ao ácido, mas, também, devido à incorporação do mesmo no esmalte, quando em níveis de pH reduzidos. Perante a formação da película adquirida no esmalte (uma camada absorvente à base de proteínas), a proteção contra a desmineralização é, também, aumentada, uma vez que esta impede fisicamente o ácido de entrar em contacto com a superfície dentária. A interação da película com os agentes anti-erosivos, F e Sn, proporciona uma maior proteção pelos precipitados de CaF_2 , mais estáveis que os precipitados normais (Algarni et al., 2015). Assim, de forma a proteger o esmalte da erosão provocada pelos ácidos, é necessário aplicar mais compostos que o habitual flúor

para formação de CaF_2 , devido à sua ação limitada. O estanho consegue formar depósitos, seja no esmalte erodido ou no esmalte não erodido, em camadas mais profundas que os outros iões, aumentando o seu potencial de proteção quantas mais vezes for aplicado. A sua aplicação apresenta várias formas, como pastas dentífricas ou colutórios, e obteve resultados positivos quando testada (Lussi & Carvalho, 2015).

O fluoreto de amina, AmF , e as suas propriedades antibacterianas são vastamente conhecidas. Este fluoreto orgânico possui a particularidade de se espalhar rapidamente pela superfície dentária que, devido às suas propriedades tensioativas, evita o contacto entre o dente e a placa bacteriana. Quando combinados, o fluoreto de amina (AmF) e o fluoreto de estanho (SnF_2), tendem a potenciar o seu efeito na proteção contra os compostos acídicos e na redução da acumulação e crescimento de bactérias (Madlén, 2013).

A saliva é uma substância fundamental na prevenção da erosão dentária. A sua capacidade tampão e de neutralização de ácidos, o aumento do seu fluxo em resposta a alimentos de pH elevado, fazem com que forneça o cálcio e o fosfato necessários à remineralização do esmalte. Este facto evidencia a importância da saliva como fator decisivo na capacidade de remineralização dentária, sendo o seu fluxo e a sua composição fundamentais para que a mesma ocorra (West & Joiner, 2014). Da sua composição, para além do cálcio, fosfato e flúor, fazem também parte inúmeras proteínas, importantes na formação da película adquirida (Ionta et al., 2014). Por outro lado, as macromoléculas presentes na saliva desempenham um papel crucial na formação de um filme orgânico, denominado película adquirida do esmalte, que entrando intimamente em contacto com o esmalte o protege contra agentes erosivos, entre outros (Amaechi, Higham, Edgar, & Milosevic, 1999; M Hannig, Hess, Hoth-Hannig, & De Vrese, 2003; Matthias Hannig et al., 2004).

A implementação de medidas preventivas e um diagnóstico precoce, podem, tal como na cárie ou na periodontite, ser decisivas no sucesso do tratamento atempado da erosão dentária, quer de origem intrínseca, quer de origem extrínseca. A redução de substâncias ácidas da dieta, a adição de cálcio extra nos alimentos, a substituição de bebidas quentes por bebidas frias, são medidas que melhoram efetivamente este problema ocorrente em grande parte da população (West & Joiner, 2014), no que diz respeito à erosão de causa extrínseca. Contudo, o diagnóstico de erosão dentária vê-se dificultado pela ausência de metodologia simples e válida, sendo os efeitos da erosão apenas detetados clinicamente. Este fator faz com que, frequentemente, os médicos-

dentistas considerem normal a perda da superfície dentária, ignorando os primeiros sinais e não tomando as medidas preventivas como prioritárias (Zini, Krivoroutski, & Vered, 2014).

Sendo a erosão dentária um problema frequente na saúde oral, e não existindo outros trabalhos na literatura que tratem os três momentos de aplicação do flúor, a realização deste estudo pretende investigar e perceber qual o momento mais favorável à aplicação do colutório de fluoreto de estanho e fluoreto de amina, com o objetivo de remineralizar a superfície erodida do esmalte.

Foram objetivos do presente estudo:

- Aplicar um colutório à base de flúor no esmalte erodido, em distintos “timings” de aplicação (“antes”, “depois”, “antes e depois” do desafio erosivo);
- Medir o pH dos agentes erosivo e remineralizante;
- Comparar a microdureza de superfície, após remineralização com um colutório de fluoreto de estanho e fluoreto de amina, do esmalte erodido;
- Analisar microscopicamente a superfície do esmalte, observando os efeitos dos diferentes momentos de aplicação (“antes”, “depois”, “antes e depois” do desafio erosivo);
- Avaliar qual o momento de aplicação mais indicado à aplicação de um colutório à base de flúor para remineralização do esmalte de superfície.

Deste modo, foram equacionadas as seguintes hipóteses nulas:

- Não existem diferenças significativas na microdureza de superfície do esmalte, quando se aplica um colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, nos diferentes momentos de aplicação (“antes”, “depois”, “antes e depois” do desafio erosivo);
- Não existem diferenças significativas na análise microscópica da superfície do esmalte quando se aplica um colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, nos diferentes momentos de aplicação (“antes”, “depois”, “antes e depois” do desafio erosivo).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz. Todos os dentes do estudo foram obtidos de pacientes, da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz, preservando o anonimato e fornecidos ao banco de dentes após assinatura do respetivo consentimento informado. Os mesmos foram preservados numa solução de cloramina T a 0,5% até 6 meses após a sua extração, e conservados em água desionizada a 4°C até serem preparados e cortados.

2. LOCAL DO ESTUDO

A análise da microdureza de superfície foi realizada no Laboratório de Biomateriais do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, bem como o tratamento das restantes variáveis. A Microscopia Eletrónica de Varrimento foi efetuada no BioLab, Laboratório de Microscopia Eletrónica, no Instituto Superior Técnico, da UTL.

3. TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo experimental *in vitro*, analítico e prospetivo; encontra-se esquematizado na figura 1.

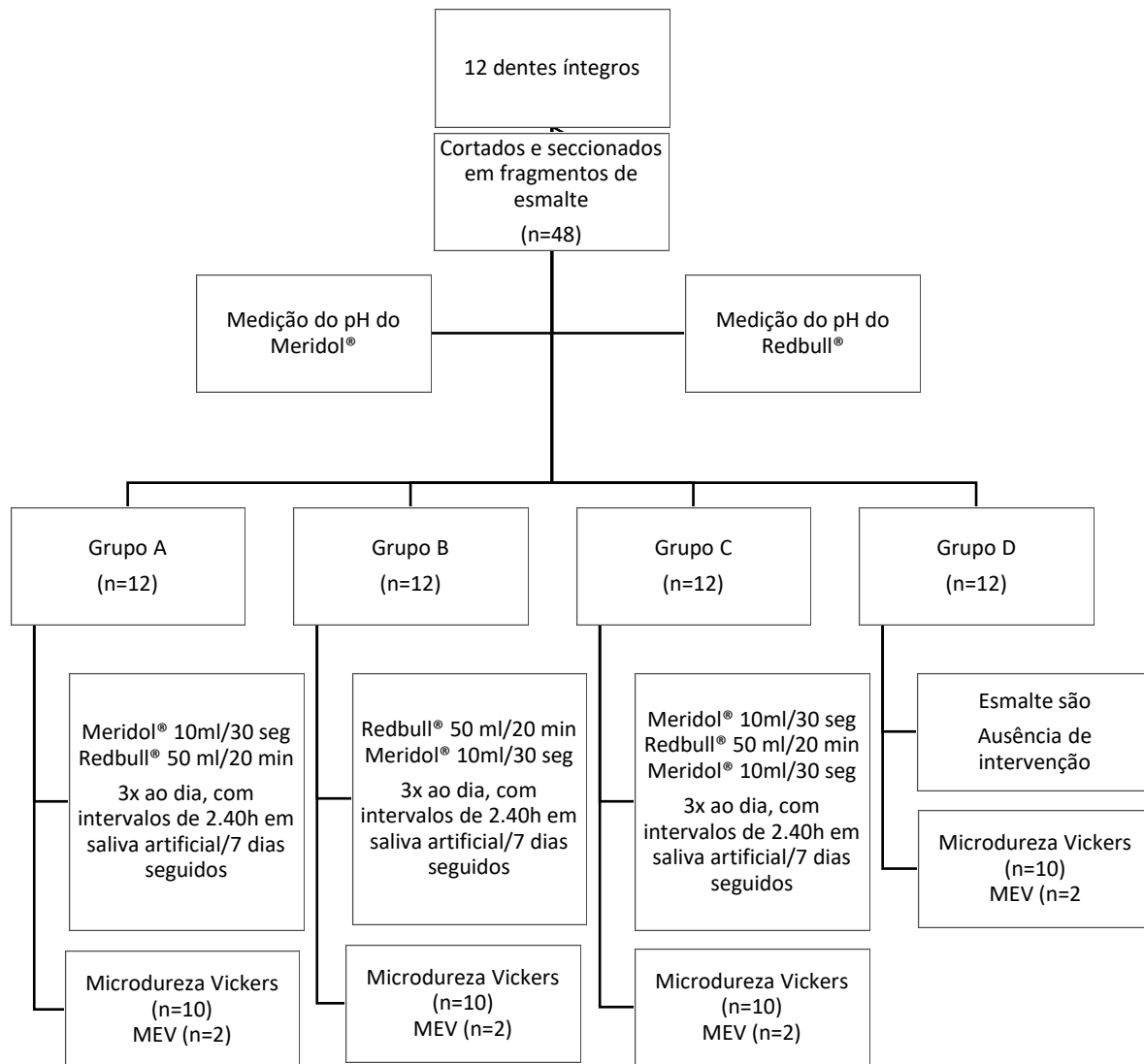


Figura 1. Esquema representativo do protocolo laboratorial.

4. SELEÇÃO DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMENES

Foram utilizados 12 molares permanentes íntegros, sem cáries nem fracturas e sem alterações visíveis na superfície do esmalte – critérios de inclusão; sendo excluídos todos os molares com malformações, não íntegros, decíduos, submetidos a tratamentos químicos (por exemplo, o branqueamento dentário), mecânicos (por exemplo, o tratamento ortodôntico) ou electromagnéticos (por exemplo, a radiação por laser) – critérios de exclusão.

Os espécimes foram visualizados com uma lupa esteromicroscópica Leica™ MZ6 (Leica, Germany), para a detecção de qualquer critério de exclusão.

A preparação da amostra foi executada de acordo com as seguintes etapas:

- Os dentes foram cuidadosamente limpos e desinfetados com cloramina T a 0,5%, ficando livres de detritos e de cálculo e, posteriormente armazenados em água desionizada, antes da sua utilização (Trivedi et al., 2015).
- Para obtenção dos fragmentos de esmalte da coroa dos dentes, primeiro, foi efetuado um corte longitudinal mesio-distal, ficando o dente dividido em duas metades (vestibular e lingual). De seguida, foi feita a remoção das raízes 1,0 mm abaixo da junção amelo-cementária (JAC), e seccionada a coroa, a partir das superfícies vestibulares, em fragmentos de esmalte 4x3 (Saoirse O'Toole, Mistry, Mutahar, Moazzez, & Bartlett, 2015), ficando com um total de 48 fragmentos (Fig. 2).

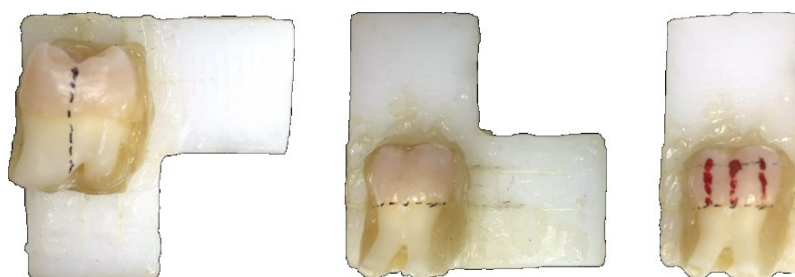


Figura 2. Cortes exemplificativos dos dentes de estudo: longitudinal – divisão entre vestibular e palatina; transversal – secção coroa/raiz; cortes 3x4 – obtenção dos fragmentos finais.

- Todos os cortes foram efetuados utilizando um micrótomo de tecidos duros Accutom-50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig. 3). O polimento dos fragmentos foi efetuado com uma lixa de água de 3 grãos diferentes (P - 220, 500 e 1200), utilizando uma polidora LaboPol-4 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig. 4), até se obter uma superfície lisa, de forma a facilitar a análise dos fragmentos.



Figura 3. Micrótomo de tecidos duros Accutom-50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) para efetuar todos os cortes dos dentes.



Figura 4. Polidora LaboPol-4 (Struers A/S. Ballerup. Dinamarca).

5. ALEATORIZAÇÃO DA AMOSTRA

Todos os molares foram selecionados aleatoriamente pelo software Excell 2010 (Microsoft® Office Excel® 2010, Microsoft® Corporation, USA), utilizando a função *fx* ALEATÓRIOENTRE.

A posteriori, os 12 dentes foram seccionados, como descrito anteriormente, em 48 fragmentos de esmalte, tendo sido distribuídos aleatoriamente por 4 grupos, com base no seu *timing* de exposição ao colutório selecionado para este estudo:

Grupo A (n=12) – Grupo de estudo (Colutório + Desafio erosivo)

- 12 espécimes foram submetidos à aplicação de um colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, AmF/SnF₂, (Meridol[®]), segundo as indicações do fabricante, 10 ml durante 30 segundos, a 60 rpm, e posteriormente sujeitos a um desafio erosivo com uma bebida carbonatada (Redbull[®]), 50 ml durante 20 minutos, a 30 rpm, 3x/dia, com um intervalo de 2 horas e 40 minutos preservados em saliva artificial numa estufa à temperatura de 37°C, durante 7 dias seguidos.
- 10 espécimes foram submetidos ao teste de microdureza Vickers;
- 2 espécimes foram analisados através de Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV).

Grupo B (n=12) – Grupo de estudo (Desafio erosivo + Colutório)

- 12 espécimes foram submetidos, em primeiro lugar, a um desafio erosivo com uma bebida carbonatada (Redbull[®]), 50 ml durante 20 minutos, a 30 rpm, e, de seguida, à aplicação de um colutório de AmF/SnF₂ (Meridol[®]), segundo as indicações do fabricante, 10ml durante 30 segundos, a 60 rpm, 3x/dia, com um intervalo de 2 horas e 40 minutos, preservados em saliva artificial numa estufa à temperatura de 37°C, durante 7 dias seguidos.
- 10 espécimes foram submetidos ao teste de microdureza Vickers;
- 2 espécimes foram analisados através de Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV).

Grupo C (n=12) – Grupo de estudo (Colutório + Desafio Erosivo + Colutório)

- 12 espécimes foram submetidos à aplicação de um colutório de AmF/SnF₂ (Meridol[®]), segundo as indicações do fabricante, 10ml durante 30 segundos, a 60 rpm, sendo, de seguida, submetidos a um desafio erosivo com uma bebida carbonatada (Redbull[®]), 50 ml durante 20 minutos, a 30 rpm, e posteriormente foram novamente submetidos à aplicação de um colutório de AmF/SnF₂ (Meridol[®]) 3x/dia, com um intervalo de 2 horas e 40 minutos, preservados em saliva artificial numa estufa à temperatura de 37°C, durante 7 dias seguidos.

- 10 espécimenes foram submetidos ao teste de microdureza Vickers;
- 2 espécimenes foram analisados através de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV).

Grupo D (n=12) – Controlo, ausência de intervenção (Esmalte São)

- 12 espécimenes não foram sujeitos a qualquer desafio erosivo ou remineralizante, sendo apenas submetidos à análise microscópica da sua superfície.
- 10 espécimenes foram submetidos ao teste de microdureza Vickers;
- 2 espécimenes foram analisados através de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV).

6. INDUÇÃO DA EROSÃO COM BEBIDA CARBONATADA

O pH inicial do meio erosivo, a bebida carbonatada RedBull® (Fig. 5), foi inicialmente medido utilizando um medidor digital de pH (Trivedi et al., 2015) – potenciómetro com eléctrodo de pH (Basic20® - Crison) (Fig. 6) – previamente calibrado (Wang et al., 2014). Esta medição foi realizada num gobelé de 50 ml, à temperatura ambiente de 21°C e à temperatura de refrigeração, 4°C.



Figura 5. Bebida energética e carbonatada, RedBull® - agente erosivo.

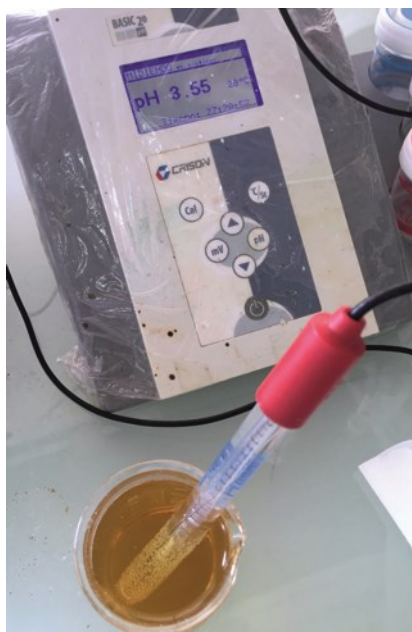


Figura 6. Potenciômetro para medição do pH das soluções.

O procedimento para a respectiva indução da erosão do esmalte dentário, consistiu em colocar os fragmentos em 50 ml da bebida carbonatada (Redbull®) num gobelê e, de seguida, num agitador magnético (Wang et al., 2014) com um íman a 30 rpm e a uma temperatura de 37°, durante 20 minutos, 3 vezes por dia, com intervalos de 2 horas e 40 minutos entre cada desafio erosivo, durante 7 dias consecutivos.

7. APLICAÇÃO DO AGENTE REMINERALIZANTE

Aos 36 espécimes de esmalte, aleatoriamente selecionados e divididos em 3 grupos de estudo, foi aplicado o agente remineralizante, Meridol® (GABA International AG, Switzerland) (Fig. 7) com a seguinte composição: 0.025% F⁻ (125 ppm F⁻ de fluoreto de amina, 125 ppm F⁻ de fluoreto de estanho), água, óleo de rícino hidrogenado PEG-40, PVP, xilitol, aroma, sacarina de sódio e Cl 42051 (Dadamio et al., 2013).

O processo de remineralização foi efetuado submergindo-se os fragmentos de esmalte em 10ml de colutório num gobelé, durante 30 segundos, segundo as indicações do fabricante (Meridol®, GABA, Therwill, Suíça, lote: 5317PL1111 e validade: 10/2017). Foi também utilizando um agitador magnético, Agimatic-N Selecta® (Fig. 8), com um íman a 60 rpm e a uma temperatura de 37°, simulando o bochecho em boca (Saoirse O'Toole et al., 2015).



Figura 7. Colutório Meridol® utilizado como agente remineralizante.



Figura 8. Agitador magnético Agimatic-N Selecta®.

Nos intervalos da intervenção, os espécimenes foram lavados com água desionizada e conservados em saliva artificial numa estufa a 37°C (Wang et al., 2014). A saliva artificial, apresentando um pH entre 6,9 e 7, foi realizada de acordo com a seguinte composição (Urban et al., 2009):

- 0,02 mM de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfito de sódio nano-hidratado);
- 6,84 mM de NaCl (cloreto de sódio), 5,36 mM de KCl (cloreto de potássio);
- 4,42 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado);
- 16,65 mM de Ureia;
- 1,80 mM de CaCl_2 (cloreto de cálcio);
- 1000 mL de água desionizada.

8. TESTE MICRODUREZA DE VICKERS

Foi efetuada a medição da microdureza de 10 fragmentos de cada grupo (A-D), utilizando o teste de dureza de Vickers, a fim de fazer a distribuição estratificada das amostras nos grupos a serem testados (Caneppele, Jeronymo, Di Nicoló, de Araújo, & Soares, 2012).

Para realizar a medição foi utilizado o indentador HSV-30[®] (Shimadzu) (Fig. 9), com uma carga de 29,42 N durante 5 segundos. Efetuaram-se cinco indentações (Caneppele et al., 2012) em cada espécime dos quatro grupos, obtendo-se um valor total de 200 medições (Fig. 10).

Os resultados obtidos foram tratados quantitativamente e organizados num documento Excell, obtendo-se o valor médio e o desvio padrão – medidas de tendência central.

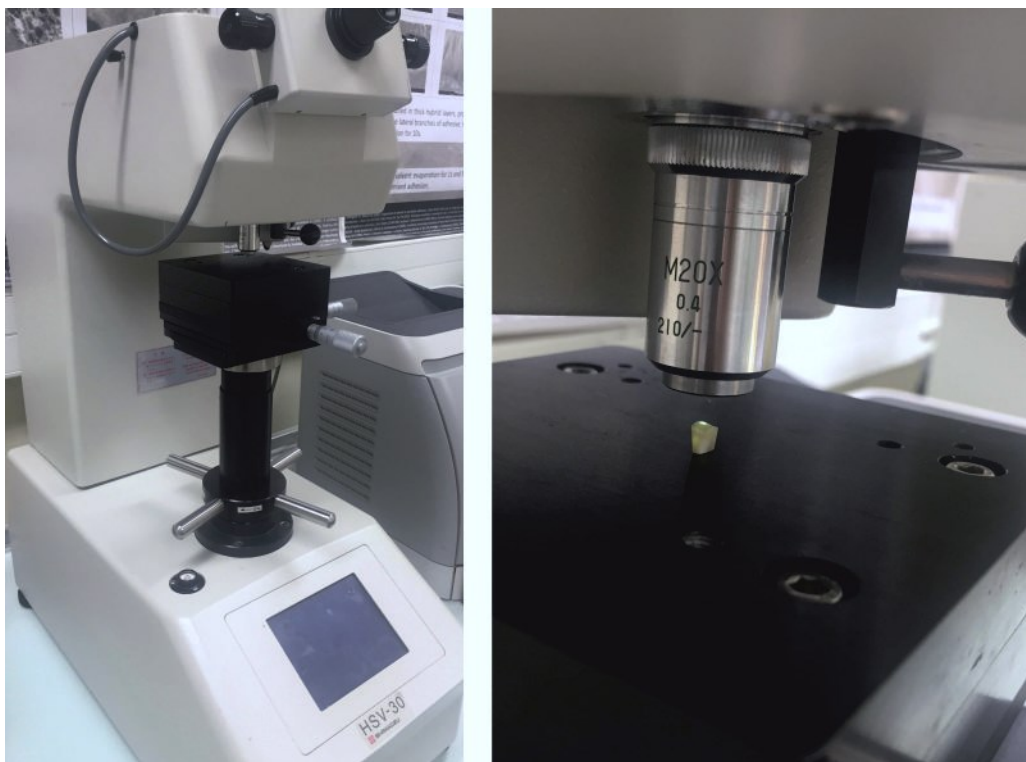


Figura 9. Indentador HSV-30[®] (Shimadzu) utilizado para medir a dureza Vickers (à esquerda) e pormenor da lente em processo de zoom com um fragmento (à direita).

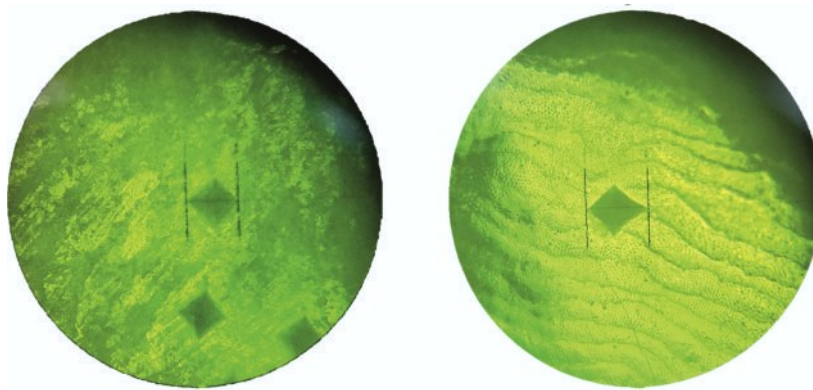


Figura 10. Indentações Vickers em esmalte submetido aos desafios erosivo e remineralizante (à esquerda) e em esmalte são, não submetido a nenhum dos desafios (à direita).

9. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (MEV)

Foi avaliada a topografia da superfície de 2 fragmentos de cada grupo, através da Microscopia Electrónica de Varrimento – MEV (Chen, Parolia, Pau, & Celerino De Moraes Porto, 2015).

A preparação dos espécimenes foi efetuada utilizando um Quorum Q150T ES (Fig.11), segundo o seguinte protocolo: primeiro, cada espécimene foi colocado sobre uma fita de carbono numa base apropriada ao instrumento (Fig.12), de forma a manter os mesmos sem alterar a sua posição; de seguida, foi colocada a base dentro da respetiva máquina (Fig. 13), que desidratou os fragmentos em vácuo com um banho de uma liga metálica de ouro-paládio a 20 mA e 1,4 kV (Fig. 14).

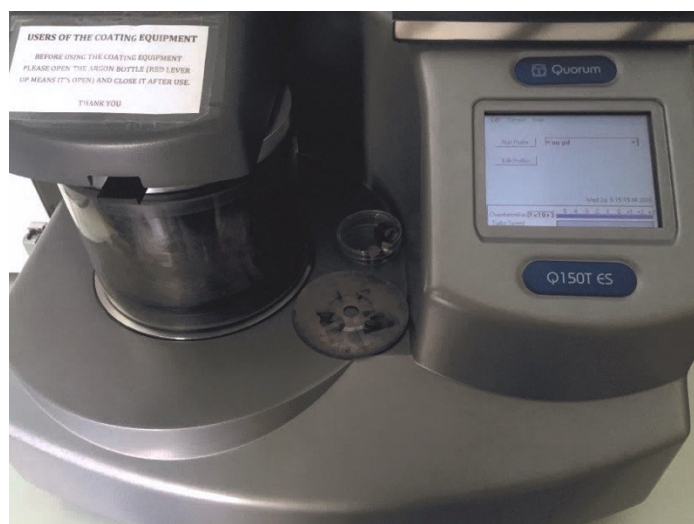


Figura 11. Quorum Q150T ES, Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coater, utilizado para desidrar os espécimenes em vácuo.

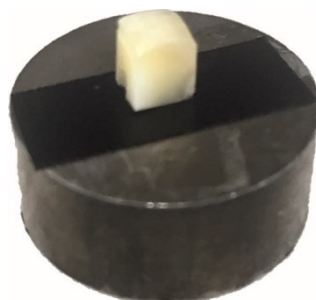


Figura 12. Fragmento sobre a fita adesiva de carbono, na base apropriada.



Figura 13. Interior da máquina Quorum Q150T ES, com a amostra preparada para ser submetida ao banho de uma liga metálica de ouro-paládio em vácuo.

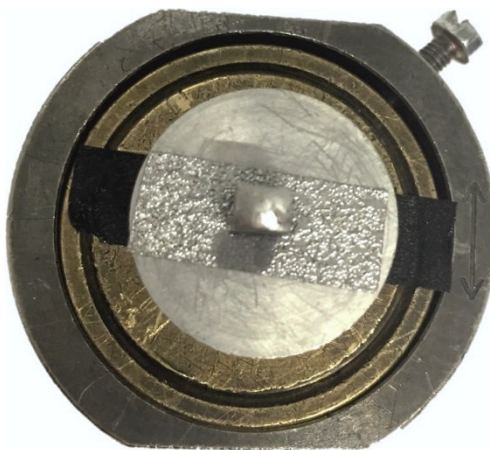


Figura 14. Amostra após banho com uma liga metálica de ouro-paládio; é possível observar a camada metálica que cobre a superfície da amostra.

Quando totalmente desidratados, foi possível observar os espécimes através do microscópio JEOL JSM-700001F (Fig. 15), que bombardeia a amostra com um fecho de elétrons secundários, sendo possível visualizar os espécimes individualmente, com várias ampliações.



Figura 15. Microscópio JEOL JSM-700001F (à esquerda), onde foram observados os espécimes e (à direita) pormenor do interior onde foram colocados os espécimes para observação em microscopia eletrónica de varrimento.

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa IBM® SPSS® Statistics versão 24, realizando o teste ANOVA a um fator com um IC de 95% e teste *post-hoc* de Games Howell.

“Timing” na aplicação de um colutório à base de flúor no esmalte erodido

RESULTADOS

1. VALORES DE PH

Foram efetuadas as medições de pH dos agentes erosivo e remineralizante, obtendo-se os valores indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das medições de pH dos agentes remineralizante e erosivo, à temperatura ambiente e em refrigeração.

Agente	Valores de pH
Meridol®	4,24
RedBull® (4°C)	3,55
RedBull® (24°C)	3,46

2. VALORES DE MICRODUREZA DE VICKERS

Após a execução de todos os procedimentos do estudo, nos vários grupos, foram feitas as medições em todos os espécimes, em dureza Vickers (HV) (Tabela 2) e em Mega Pascal (MPa) (Tabela 3). Os resultados obtidos foram tratados, calculadas as médias das 5 indentações de cada um dos 10 fragmentos, dos respectivos grupos.

Tabela 2. Média dos valores da microdureza Vickers, em HV, das cinco indentações efetuadas em cada fragmento.

Grupo/Média Indentações por Fragmento	A	B	C	D
1	439,6	321,2	462,0	367,0
2	445,4	311,6	475,0	319,8
3	446,0	338,8	488,0	360,0
4	437,6	342,8	453,0	387,8
5	438,2	327,8	452,6	336,8
6	440,2	305,6	491,0	378,0
7	459,0	311,8	453,4	333,6
8	452,8	329,2	447,4	365,8
9	431,4	314,4	484,5	386,6
10	429,6	302,0	491,6	340,4
Média Total HV	441,98	320,52	469,85	357,58
Desvio-padrão Total HV	12,43	18,69	13,35	4,42

Tabela 3. Média dos valores da microdureza Vickers, em MPa, das cinco indentações efetuadas em cada fragmento.

Grupo/Média Indentações por Fragmento	A	B	C	D
1	1455	1011,4	1546	1164,8
2	1479,2	982,6	1597	1006,2
3	1481,4	1065,6	1653,4	1141,6
4	1447,6	1076,2	1509	1240,2
5	1450,2	1030	1507,4	1058,6
6	1456,8	964,8	1665,6	1204,8
7	1532,8	983,6	1511	1038
8	1508,4	1036	1486,4	1197,2
9	1421	991	1637,5	1237,6
10	1455	953,4	1667,8	1068
Média Total MPa	1468,74	1009,46	1571,5	1135,7
Desvio-padrão Total MPa	53,85	56,76	54,19	20,07

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os 4 grupos de amostras independentes foram analisados por um teste ANOVA a um fator (Tabela 4), formulando as seguintes hipóteses:

- H0 – as amostras são idênticas (não existem diferenças significativas)
- H1– as amostras não são idênticas (existem diferenças significativas entre si)

Tabela 4. Valores da amostra (N), mostrando que todos os grupos apresentam o mesmo número de medições Vickers.

		Valid		Cases Missing		Total	
Grupos		N	Percent	N	Percent	N	Percent
HV	A (C+R)	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	B (R+C)	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	C (C+R+C)	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	D (E.São)	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

Para tal, foi confirmada a normalidade das amostras pelo teste de Shapiro-Wilk para amostras pequenas (Tabela 5), tendo-se obtido um valor de significância superior a 0,05 para todos os grupos ($p>0,050$). Pelo teste de Levene, verificou-se não haver homogeneidade das variâncias dos vários grupos ($p=0,003$).

Tabela 5. Teste de normalidade aplicado a cada grupo, verificando que todas as amostras analisadas (grupos A-D) são normais.

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Grupos	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HV	A (C+R)	,178	10	,200 [*]	,955	10	,723
	B (R+C)	,171	10	,200 [*]	,947	10	,635
	C (C+R+C)	,220	10	,187	,854	10	,064
	D (E.SAO)	,166	10	,200 [*]	,934	10	,490

^{*}. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Foram verificados os valores da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, dos valores de microdureza, relativos a cada grupo (Tabela 6) (Fig. 16).

Tabela 6. Tabela descritiva com os valores da média de todos os grupos, inclusive o valor máximo e o mínimo da microdureza dos respectivos grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A (C+R)	10	441,980	9,0806	2,8715	435,484	448,476	429,6	459,0
B (R+C)	10	320,520	13,8163	4,3691	310,636	330,404	302,0	342,8
C (C+R+C)	10	469,850	17,9773	5,6849	456,990	482,710	447,4	491,6
D (E.SAO)	10	357,580	23,7203	7,5010	340,612	374,548	319,8	387,8
Total	40	397,482	63,6009	10,0562	377,142	417,823	302,0	491,6

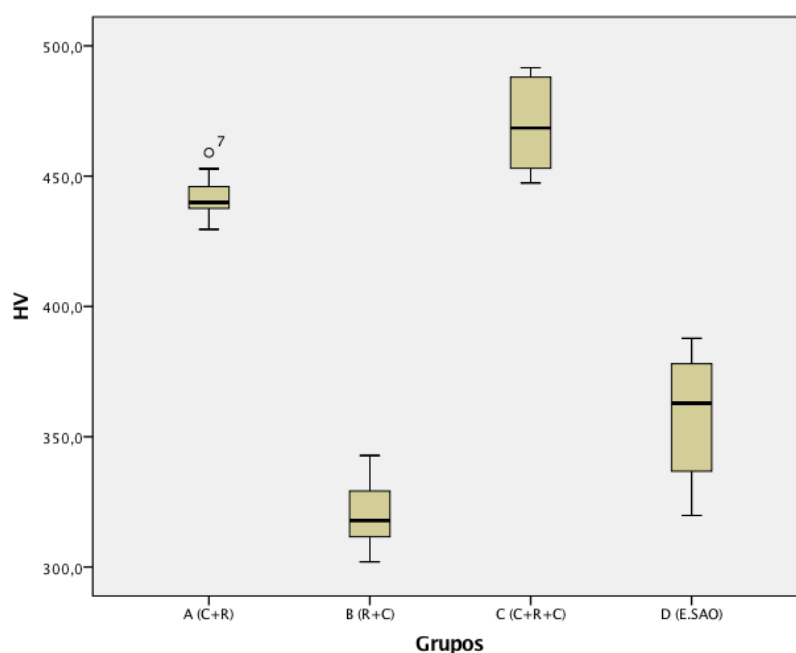


Figura 16. Diagrama de caixa dos valores de microdureza obtidos em cada grupo (N=10).

O teste paramétrico ANOVA a um fator (Fig. 17) revelou existirem diferenças significativas nos grupos de estudo, $F(3,36)=169,458$, $p<0,001$. Com o intuito de comparar pares de grupos e avaliar o(s) que difere(m), prosseguiu-se com a aplicação de um teste de comparação múltipla *post-hoc*, tendo-se optado pelo teste de Games-Howell, atendendo à desigualdade das variâncias e ao tamanho das amostras. Os resultados revelaram a existência de diferenças significativas entre todos os grupos, permitindo concluir:

- O grupo C apresentou uma média superior a todos os outros grupos, indicando que a adição de colutório antes e depois do desafio erosivo originou um valor de microdureza de esmalte significativamente superior a qualquer um dos grupos ensaiados;
- O grupo B apresentou uma média inferior a todos os outros grupos, indicando que a adição de colutório depois do desafio erosivo originou um valor de microdureza do esmalte inferior a qualquer um dos outros grupos ensaiados;
- O grupo D (esmalte são, controlo) apresentou uma média superior à do grupo B, mas inferior à dos grupos A e C.

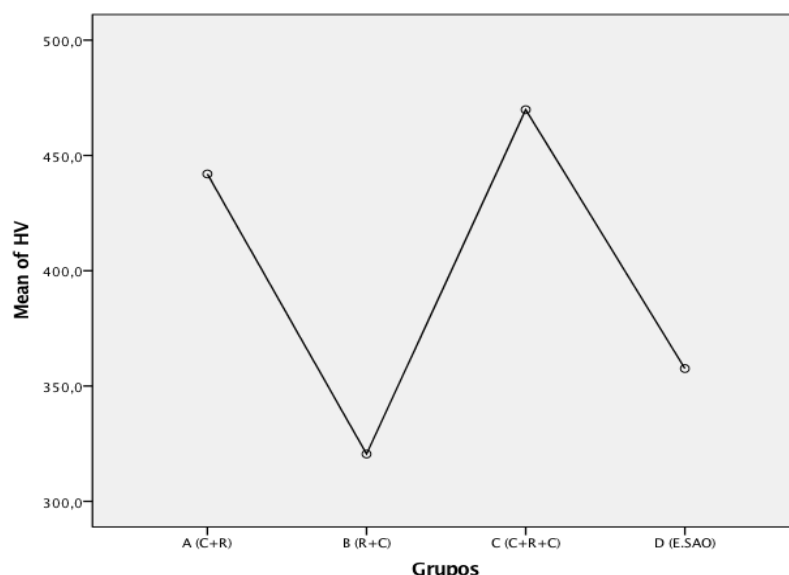


Figura 17. Representação gráfica da média de cada grupo, evidenciando a diferença numérica entre os mesmos, detetada pelo teste de ANOVA a um fator e sugerindo as comparações/contrastes mais relevantes a analisar pelo método das comparações múltiplas.

4. RESULTADOS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO

Grupo A (n=2): Colutório + Desafio erosivo

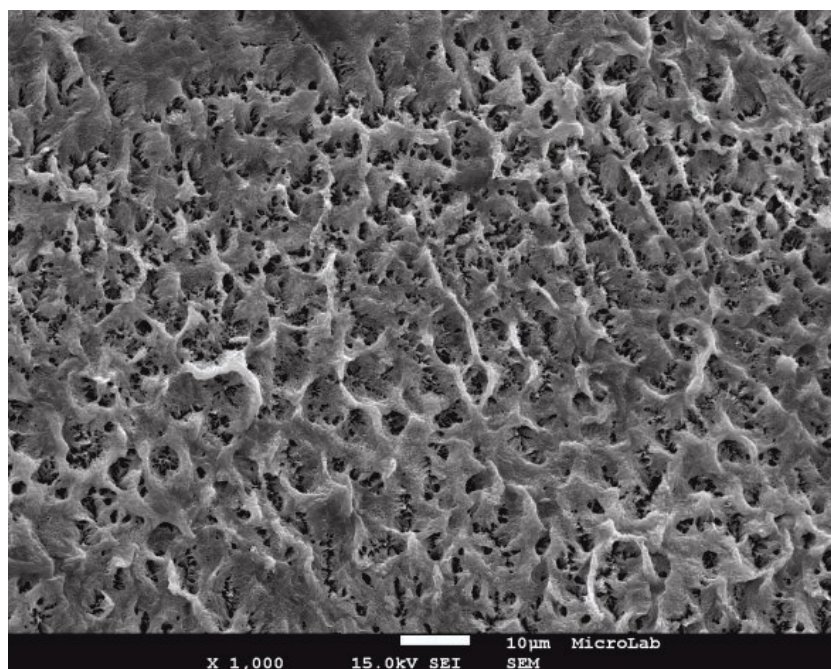


Figura 18. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. É visível a consistência da superfície, apresentando uma imagem uniforme.

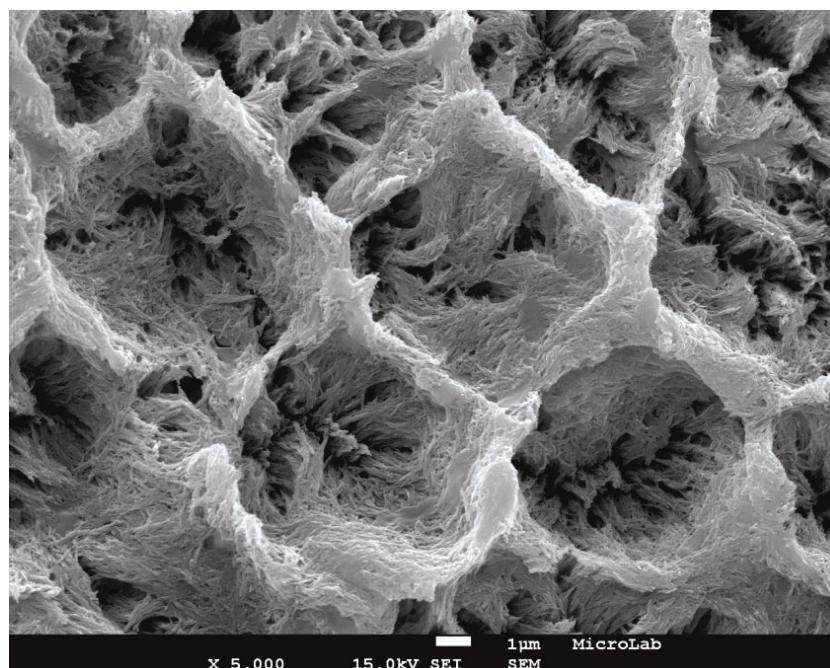


Figura 19. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. Observa-se uma organização evidente, sob a forma de “favos de mel”, evidenciando zonas mais profundas e zonas mais remineralizadas.

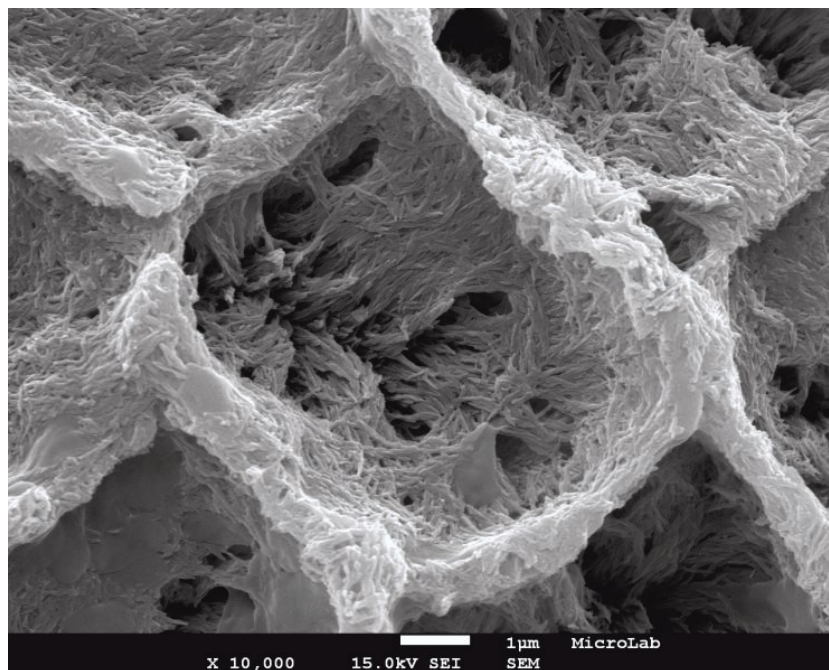


Figura 20. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente ao ciclo erosivo. O interior de um “favo de mel”, em que é possível observar o centro do mesmo a uma maior profundidade; a periferia mais remineralizada, evidenciando os depósitos de fluoreto nesta estrutura.

Neste grupo observou-se uma superfície de esmalte constante (Fig. 18), apresentando em toda a sua estrutura os característicos “favos de mel” (Fig. 19), com zonas de remineralização evidente na periferia dos mesmos. No seu interior, uma maior profundidade provocada pelo desafio erosivo a que foram submetidos os espécimes (Fig. 20). O efeito dos depósitos de fluoreto, no momento da remineralização, confere uma proteção acrescida antes do desafio erosivo.

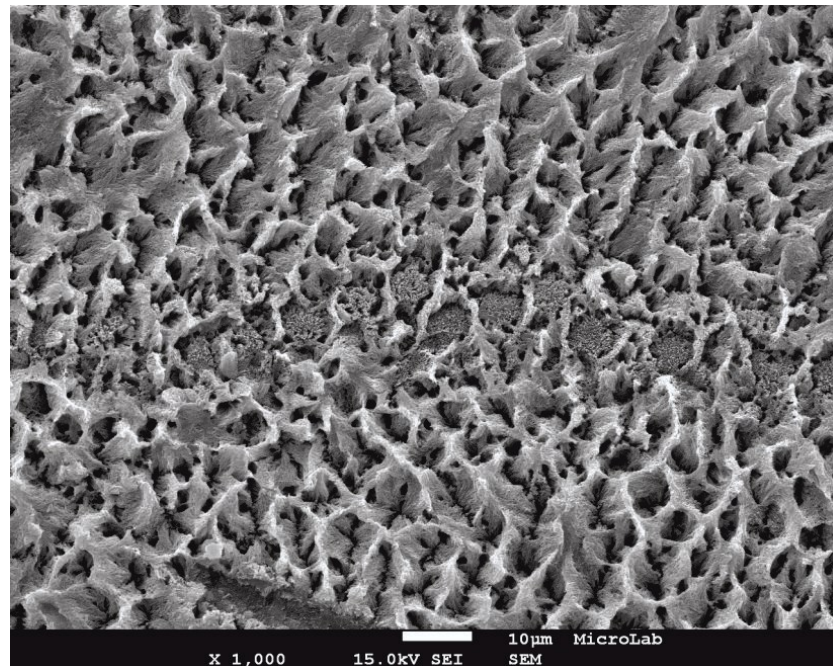
Grupo B (n=2): Desafio erosivo + Colutório

Figura 21. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Nesta imagem é de realçar as zonas de desmineralização evidente, como a zona central, apresentando uma consistência inconstante em toda a sua superfície.

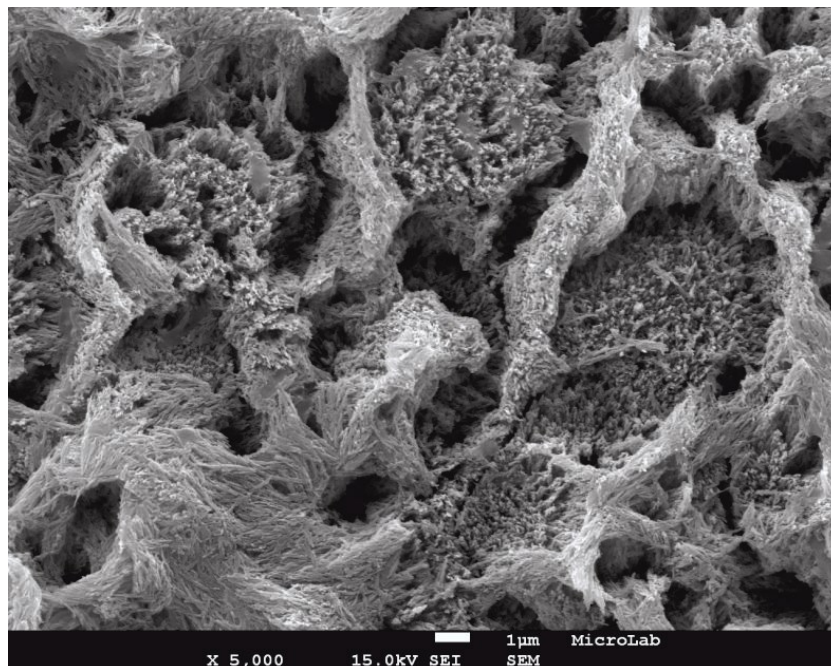


Figura 22. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Aproximação às zonas de elevada desmineralização, mais cavidades e profundas, mostrando uma estrutura evidentemente desprotegida.

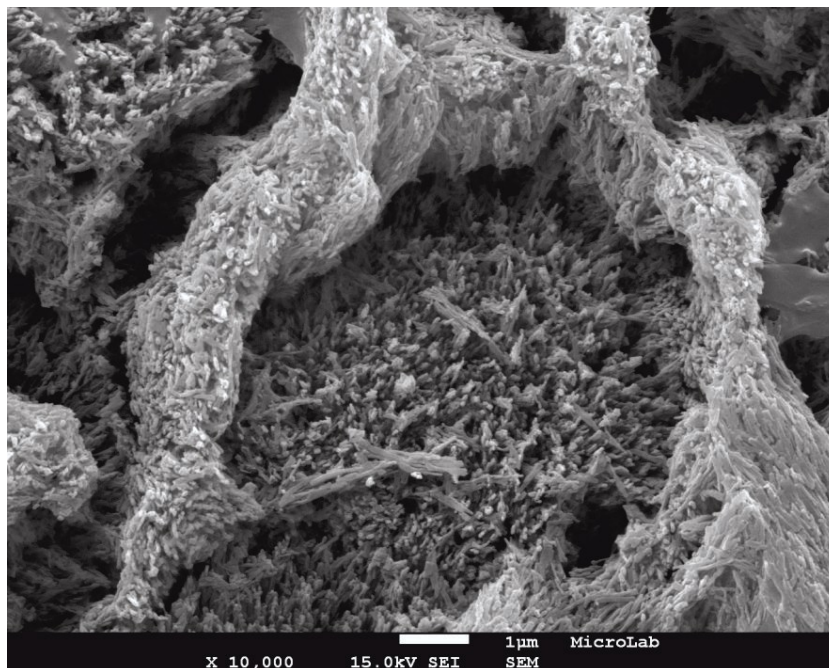


Figura 23. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização posteriormente ao ciclo erosivo. Uma imagem que seria de um dos “favos de mel” característicos do esmalte; no entanto observa-se uma estrutura visivelmente desmineralizada, que perdeu a sua forma inicial.

No grupo submetido ao desafio erosivo antes da remineralização com o colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, foi visível uma elevada desmineralização da superfície do esmalte, apresentando zonas claramente desprotegidas (Fig. 21). A desmineralização exibida nas imagens é característica deste grupo (Fig. 22), não tendo sido encontradas zonas semelhantes nos outros grupos – o que pode ser explicado devido à aplicação do agente remineralizante ser após o ciclo erosivo. Ou seja, no momento em que os espécimes foram submetidos ao desafio erosivo ainda não se encontravam protegidos pelo fluoreto, estando sujeitos a um maior efeito provocado pela erosão (Fig. 23).

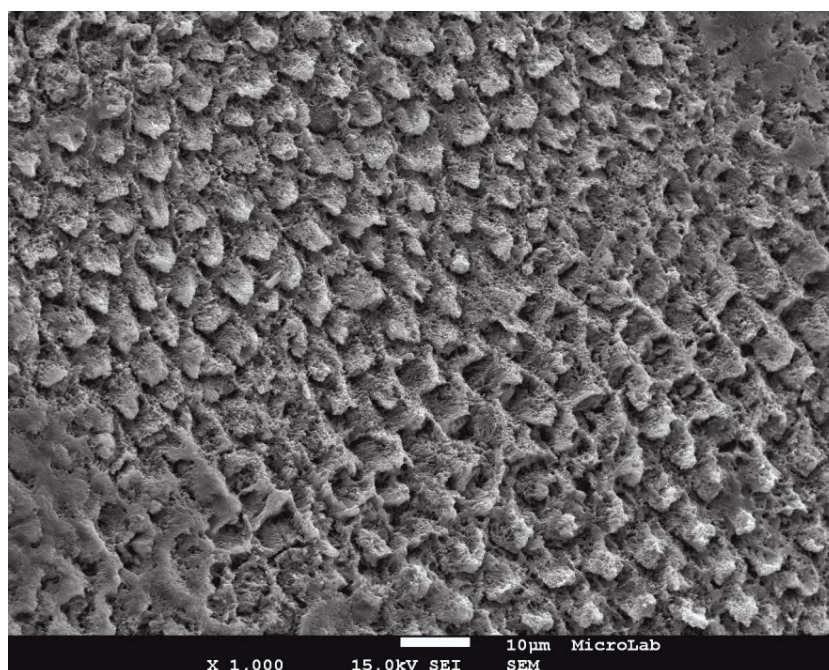
Grupo C (n=2): Colutório + Desafio erosivo + Colutório

Figura 24. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. Observam-se os típicos “favos de mel” mais preenchidos, possivelmente mais remineralizados.

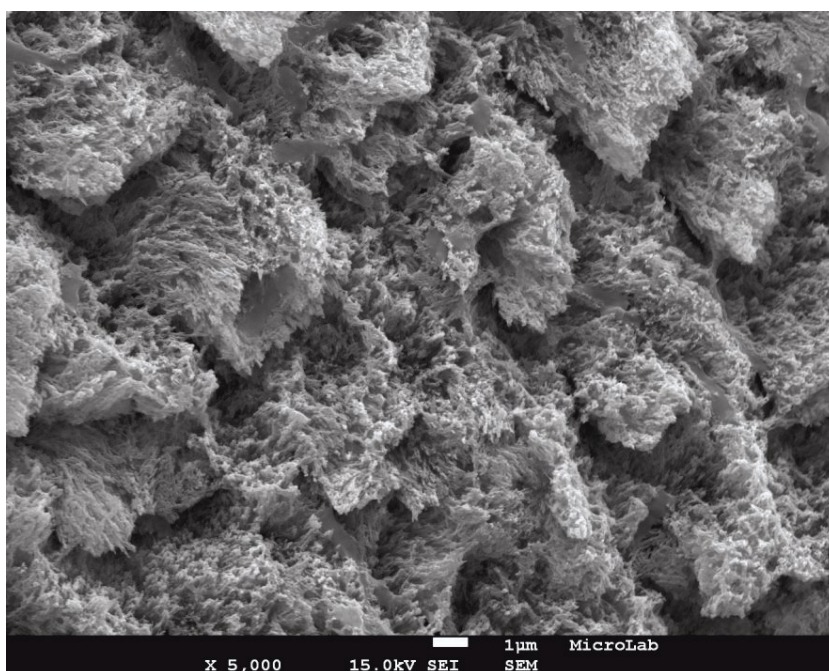


Figura 25. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x5000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. É evidente a deposição elevada de fluoreto nesta imagem, revelando uma maior capacidade remineralizante e um esmalte mais protegido.

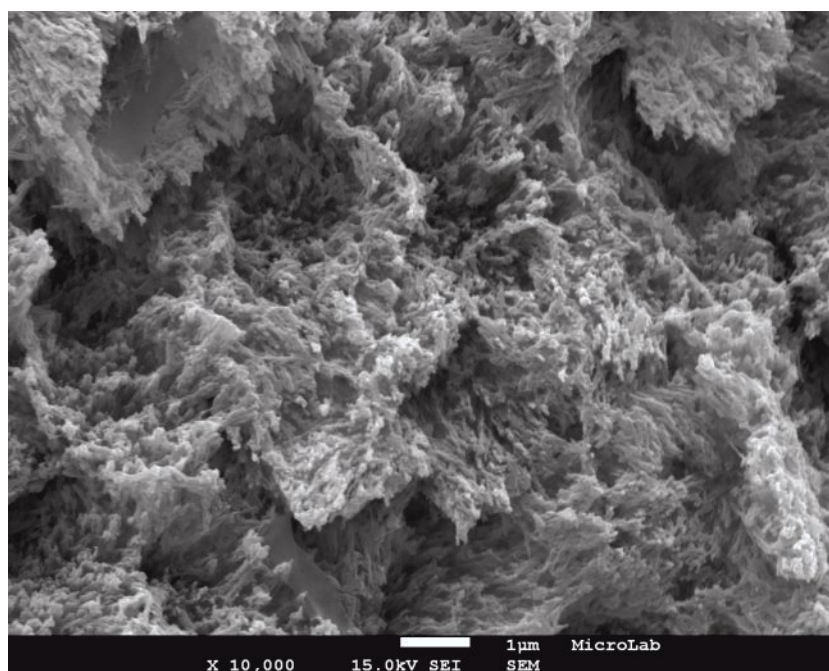


Figura 26. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. Quando aproximada a superfície do esmalte, confirmam-se os depósitos de fluoreto. Também é visível uma maior desorganização da estrutura mineral.

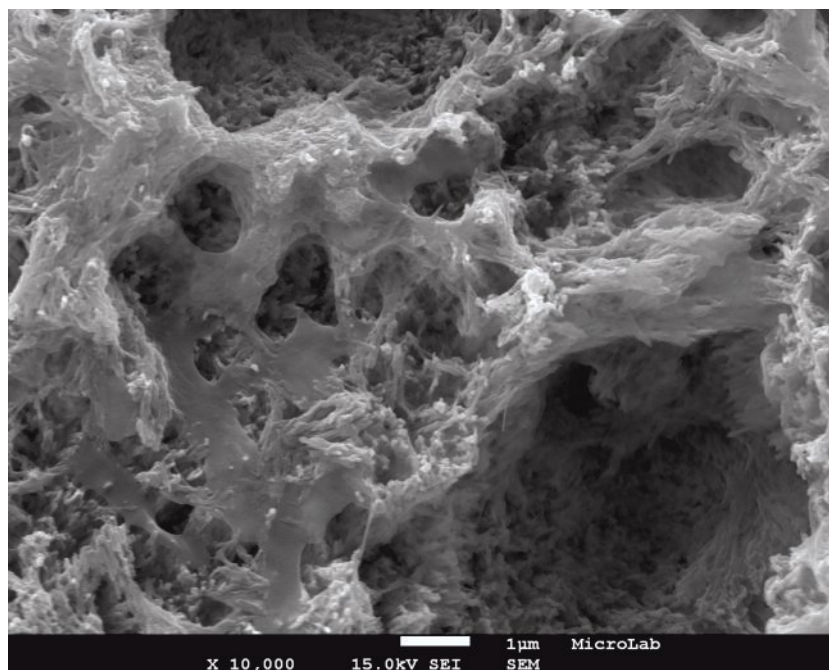


Figura 27. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após remineralização previamente e posteriormente ao ciclo erosivo. A matéria orgânica interprismática é visível nesta imagem.

No grupo C, observaram-se os prismas de esmalte mais preenchidos (fig. 24), sendo evidente o efeito remineralizante dos depósitos de fluoreto previamente ao ciclo erosivo, protegendo o esmalte, e posteriormente ao mesmo (Fig. 25). É notória uma maior desorganização quando comparados com os espécimes do grupo A (Fig. 26). No entanto, o objetivo pretendido é conseguido ao remineralizar a superfície do esmalte, minimizando o efeito erosivo causado pela bebida carbonatada. É, também, visível a matéria orgânica interprismática (Fig. 27).

Grupo D (n=2)

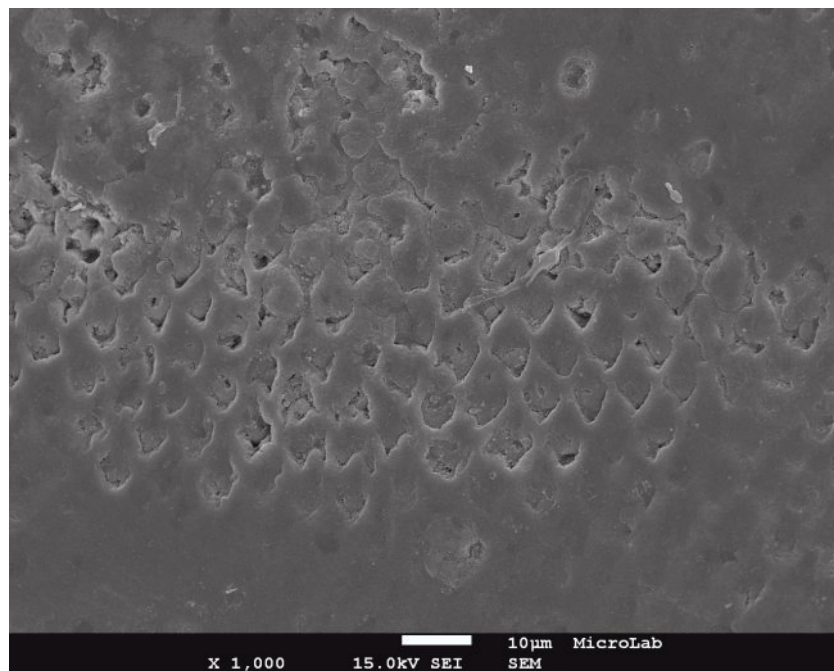


Figura 28. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x1000. O esmalte encontra-se visivelmente mineralizado, adquirindo um aspeto semelhante aos “favos de mel”.

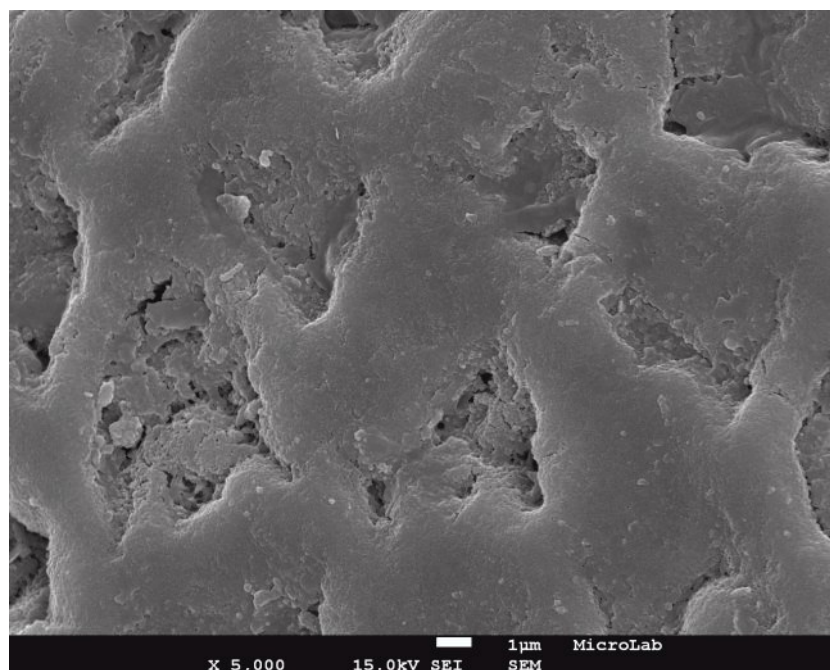


Figura 29. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x5000. Quando aproximado são perceptíveis as zonas mineralizadas, não erodidas nem submetidas a um desafio erosivo.

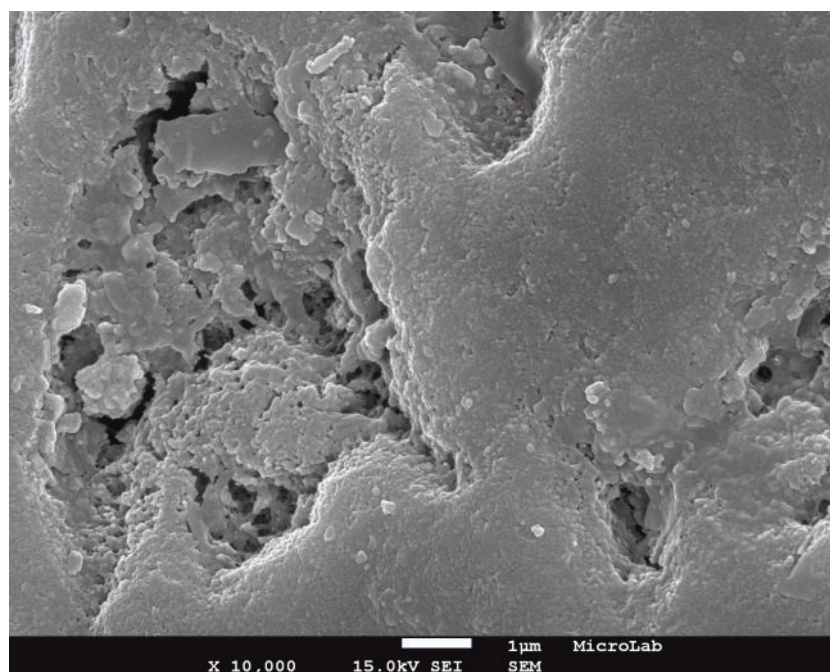
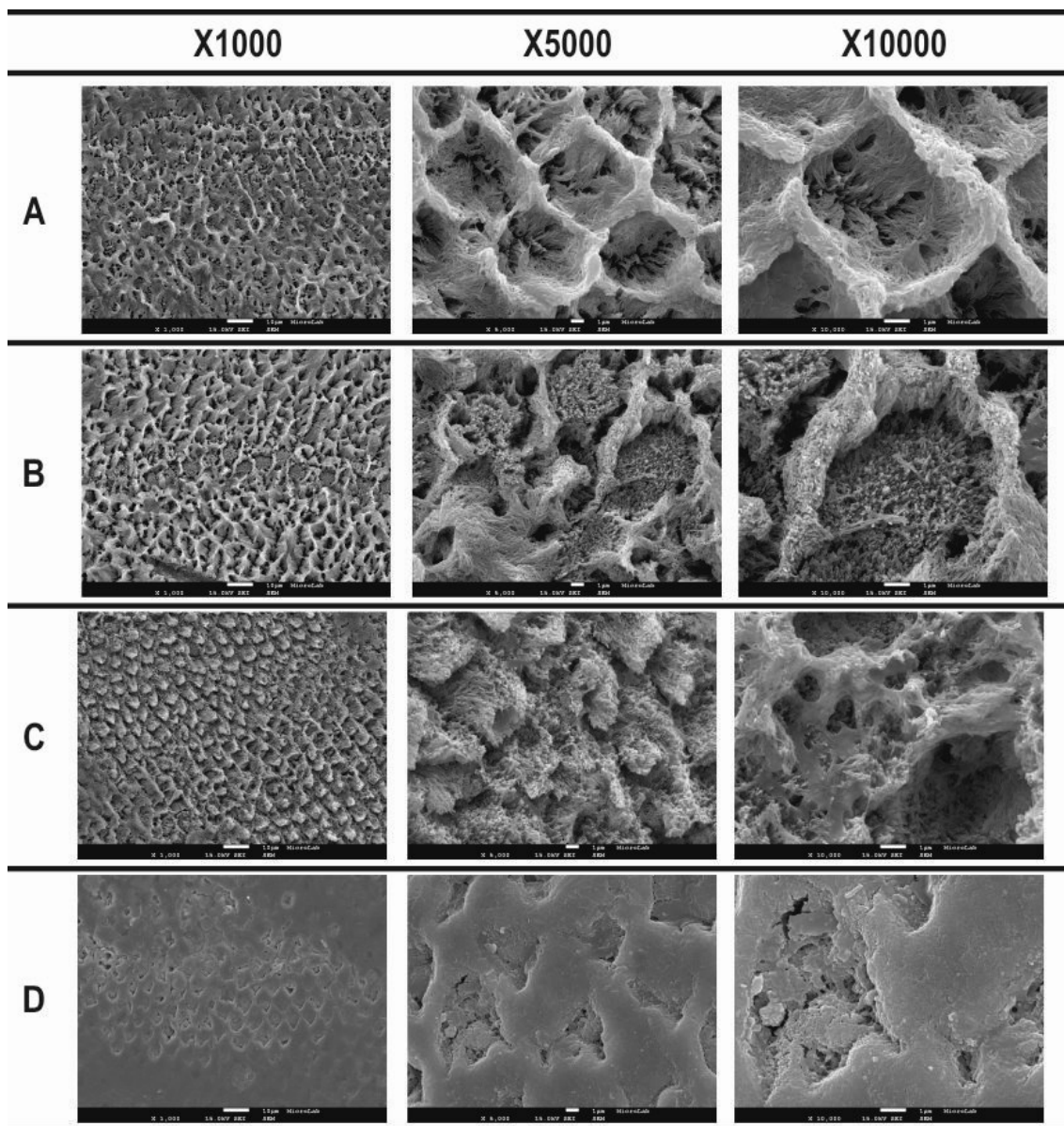


Figura 30. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte são a x10000. Encontra-se um “favo de mel” com interior ainda não cavitado nem profundo, embora as zonas mais elevadas de remineralização persistam.

No último grupo, de controlo, de esmalte são, não submetido a nenhum desafio erosivo ou remineralizante, foi consistente o aspeto preenchido da estrutura da superfície do esmalte (Fig. 28). Nestes espécimes não se observou o interior profundo dos “favos de mel”, geralmente mais desprotegidos, e evidenciando, assim, o efeito da desmineralização visível na superfície dos restantes grupos.

5. RESUMO DAS IMAGENS OBTIDAS POR MEV

Tabela 7. Imagens comparativas da visão panorâmica da superfície de esmalte dos vários grupos, nas diferentes ampliações observadas.



Através da observação das imagens anteriores, verificou-se, nos grupos A e C, o aspeto característico dos prismas de esmalte em “favos de mel”, embora ligeiramente mais preenchidos no grupo C. Estes dois grupos foram submetidos ao processo de remineralização antes do ciclo erosivo, o que pode explicar a sua estrutura remineralizada e a presença de depósitos de fluoreto na sua superfície. O preenchimento ligeiramente mais elevado do grupo C encontra-se em concordância com o facto dos seus espécimes terem sido submetidos a dois processos de remineralização, antes e depois do desafio erosivo.

No grupo B, submetido à remineralização da sua superfície após o desafio erosivo, os cristais de esmalte encontram-se mais erodidos, apresentando zonas evidentemente desmineralizadas, que se encontravam desprotegidas no momento de aplicação da bebida erosiva. Estas zonas foram encontradas apenas neste grupo.

O grupo de controlo, D, mostrou imagens consistentes com o esmalte são, com uma estrutura mais preenchida (Fig. 29), mineralizada e com uma maior desorganização estrutural (Fig. 30).

DISCUSSÃO

Na concretização deste estudo, a aplicação do colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, em diferentes momentos, teve um efeito significativo na microdureza de superfície do esmalte erodido, rejeitando, assim, a primeira hipótese nula. A segunda hipótese nula foi também rejeitada, uma vez que os resultados obtidos na microscopia eletrônica de varrimento mostraram existir diferenças significativas na morfologia da superfície do esmalte erodido, quando remineralizado nos diferentes “timings”.

No geral, os resultados obtidos sugerem que o colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho é de elevada eficácia na remineralização do esmalte quando aplicado antes do desafio erosivo. Este achado suporta o trabalho de outros autores como, por exemplo, O’Toole et al. (2015), que mostraram que o fluoreto de estanho, quando em conjunto com a saliva, é mais eficaz antes do desafio erosivo do que depois do mesmo. O maior potencial de ação deste composto quando aplicado na superfície do esmalte previamente ao ciclo de desmineralização, pode ser explicado devido ao pH ácido das suas fórmulas, o que lhe confere a capacidade de incorporar os seus iões na estrutura cristalina da hidroxiapatite antes da mesma ser submetida ao desafio erosivo. O mesmo grupo de investigadores realizou, também, o primeiro estudo relativo ao momento de aplicação mais favorável deste fluoreto (O’Toole et al., 2015), concluindo que a proteção que o estanho confere à superfície do esmalte faz com que esta se encontre menos suscetível à erosão provocada pelas substâncias ácidas.

O presente trabalho teve como enfoque a sequência de tratamento para a remineralização da superfície do esmalte, acrescentando aos *timings* “antes” e “depois”, o momento de dupla aplicação de colutório – *timing* “antes e depois”. Este momento revelou o valor mais elevado de microdureza Vickers, com uma média de $469,85 \pm 17,98$ HV (grupo C). Lussi & Carvalho (2015) também observaram que quanto mais aplicações de fluoreto de estanho forem efetuadas na superfície do esmalte, maior será o seu potencial remineralizante. Apesar deste valor ter sido o registo com maior microdureza, houve outro grupo que se destacou perante os resultados: o grupo A, com o momento de aplicação “antes” do desafio erosivo, também obteve a média elevada de $441,98 \pm 9,08$ HV, o que demonstra que, apenas para uma aplicação de colutório, a eficácia do fluoreto de estanho depende do momento em que é aplicado, como descrito anteriormente.

Por outro lado, os resultados alcançados para o grupo B, em que a aplicação do colutório foi após o desafio erosivo (*timing* “depois”), apresentaram uma menor microdureza de superfície do esmalte, com um valor médio de $320,52 \pm 13,82$ HV. Este valor é visivelmente discrepante dos valores encontrados para os outros grupos estudados, o que está novamente de acordo com trabalhos anteriores (O’Toole et al., 2015). Para comparação com os resultados descritos, foi utilizado o grupo controle (grupo D), em que o seu valor médio foi de $357,58 \pm 23,72$ HV.

Segundo Austin et al. (2016), a avaliação da microdureza de superfície é considerada a melhor forma de analisar uma lesão inicial no esmalte erodido. Contudo, para uma análise qualitativa mais detalhada e pormenorizada da superfície do esmalte, realizou-se a observação dos espécimes através da MEV (Lee, Chou, Chen, Liao, & Chang, 2015). Foram observadas, nesta análise, no Grupo A e C, regiões de aspeto mais uniforme, que correspondem à permanência de matéria orgânica interprismática e à oclusão prismática, devido à presença de fluoreto, respetivamente. Nestes grupos foi possível observar uma maior organização dos prismas de esmalte, sendo visível a homogeneidade da estrutura. No entanto, no grupo B, foi notória uma maior desorganização na orientação dos prismas de esmalte exposto, podendo ser observadas zonas de desmineralização evidente. Estas zonas mais cavitadas e profundas caracterizam este grupo, não estando presentes em nenhum dos outros grupos de estudo.

Assim, os resultados aqui apresentados indicam que o momento de aplicação mais favorável à remineralização do esmalte dentário, é o *timing* “antes e depois” do desafio erosivo. Sendo que, previamente ao mesmo, também foi observado um aumento significativo da microdureza, o *timing* “antes” pode ser apontado como o momento decisivo para a remineralização do esmalte erodido.

No âmbito da erosão dentária, a aplicação de agentes terapêuticos adquire uma certa relevância, tentando minimizar ou reverter os seus efeitos. De acordo com Dadamio et al. (2013), os colutórios foram introduzidos e aceites pela sociedade com sucesso, devido ao seu simples e rápido modo de aplicação, o que faz com que sejam uma opção de tratamento frequente. Os efeitos do flúor e o seu benefício nos cuidados de higiene oral, são conhecidos e explorados há muitos anos. No entanto, quando utilizado em exclusivo para formar depósitos CaF_2 , a sua proteção contra a erosão tem uma ação limitada (Lussi & Carvalho, 2015). A utilização do flúor associado a outros dois compostos, amina e estanho, sob a forma de fluoreto de amina e fluoreto de estanho, como agentes remineralizadores, é reconhecida por vários autores (Algarni et

al., 2015; Carvalho & Lussi, 2014; Lussi & Carvalho, 2015; Scaramucci et al., 2015), fornecendo qualidades como a proteção aumentada do esmalte quando sujeito ao ataque ácido. Também Kulik et al. (2015) reconhece os efeitos do fluoreto de amina e fluoreto de estanho, seja na prevenção da cárie ou na tolerância aos ácidos que confere à superfície do esmalte.

De acordo com Erdemir et al. (2012), ao longo de muitos anos, foram realizados estudos que excluíram a saliva como fator, submetendo os espécimes apenas ao desafio erosivo, sem imersão dos mesmos numa solução de saliva. Autores como O'Toole et al. (2015), nos seus trabalhos científicos, já utilizam a saliva como um fator de estudo indispensável, mostrando esta variável como um acréscimo significativo aos valores de microdureza. Estudos recentes têm vindo, cada vez mais, a comprovar a eficácia remineralizante da saliva, obtendo resultados claramente mais elevados para o esmalte quando submetido a remineralização com uma solução de saliva (Austin, Giusca, Macaulay, Moazzez, & Bartlett, 2016). Esta variante está, portanto, incluída no protocolo experimental deste trabalho, assumindo um papel fundamental na minimização dos efeitos da erosão observados no esmalte dentário.

O efeito remineralizador da saliva poderia ser explicado pelas suas propriedades, pelos seus componentes e pela película que consegue formar na superfície do esmalte. Estes fatores constituem, assim, as funções protetoras da saliva: capacidade tampão e neutralização dos ácidos, diluição e remoção dos agentes erosivos e formação da película salivar adquirida. De acordo com os autores Hannig et al. (2003), a película adquirida atua como uma barreira de difusão ou como uma membrana de permeabilidade seletiva contra as substâncias erosivas.

Contudo, é discutida na literatura a possibilidade de a maturação da película adquirida influenciar os seus variados efeitos protetores. Foi sugerido, em estudos anteriores, que apenas uma película maturada, com vários dias de formação, conseguiria adquirir certas propriedades anti-erosivas, mas, no entanto, Hannig et al. (2003) concluiu no seu estudo que até uma película com apenas 2 horas de formação protege a superfície do esmalte. Também, Hannig et al. (2004) constatou que uma película com o período de formação de somente 3 minutos oferece proteção contra o ácido cítrico. Apesar das propriedades remineralizadoras serem alcançadas, as películas com o menor nível de maturação não conseguem, por si, inibir por completo a ação erosiva das substâncias ácidas.

Segundo Loke et al. (2016), um dos mecanismos de proteção salivar mais relevantes é a sua capacidade de eliminar os ácidos através da deglutição – limpeza mecânica – bem como o aumento do seu fluxo, mantendo o pH intraoral num intervalo neutro, fisiologicamente favorável (6,8-7,8). O fluxo salivar, para além de contribuir para o fornecimento de constituintes minerais e do sistema tampão de bicarbonato, também intensifica a deglutição da saliva, limpando e diluindo os ácidos mais eficazmente. Por sua vez, o sistema tampão de bicarbonato garante a neutralização ácida, conseguindo um equilíbrio através da seguinte equação:



O bicarbonato (HCO_3^-), presente na saliva, reage com os prótons (H^+) do meio ácido originando ácido carbónico (H_2CO_3), o qual é convertido a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), pela ação da anidrase carbónica salivar. Sendo o CO_2 um gás, é facilmente libertado para a atmosfera, favorecendo o consumo de mais ácido carbónico, logo, de mais prótons e contribuindo para a reposição dos valores de pH na cavidade oral perto do neutro.

Os constituintes minerais como o flúor, o cálcio e o fosfato, remineralizam a superfície dentária: o cálcio e o fosfato retardam a dissolução do esmalte e da dentina; o flúor, em concentrações elevadas, promove a remineralização e previne a desmineralização. Igualmente relevantes são as proteínas constituintes da saliva, que possuem aptidão para agir como “tampão”, dependendo da sua estrutura e aminoácidos.

Quanto à experiência funcional, os fatores agitação e temperatura influenciam diretamente os resultados da mesma. Através do agitador e íman utilizados, foi possível simular o efeito da agitação oral quando um indivíduo bochecha com o colutório ou ingere a bebida carbonatada. Este fator, de acordo com Lussi & Carvalho (2015), também responsável pelo aumento da desmineralização do esmalte, intensifica o seu efeito conforme mais elevada é agitação no momento da ingestão da bebida. A temperatura é, conjuntamente, um fator a considerar, uma vez que o seu efeito erosivo aumenta quanto maior for a sua temperatura. No presente trabalho, a bebida foi mantida em refrigeração antes ser submetida ao desafio erosivo, pois, usualmente, as bebidas energéticas são refrigeradas a 4°C e ingeridas de seguida (Erdemir et al., 2012), enquanto que, para o momento do desafio, foi utilizada a temperatura de 37°C.

A replicação das condições e componentes que envolvem o meio da cavidade oral é extremamente difícil, sendo por isso um ambiente complicado de replicar num meio *in vitro* (Erdemir et al., 2012). Como limitações encontradas na realização do presente

trabalho, podem ser apontadas o número de espécimes da amostra, mas, principalmente, o facto da mesma ser apenas sujeita a um fator remineralizante, não sendo possível comparar com outros existentes.

De futuro, é possível acrescentar estes fatores e estudar o seu efeito, comparando a eficácia do colutório de fluoreto de amina e fluoreto de estanho com outros produtos fluoretados. O'Toole, Bartlett, & Moazzez (2016) compararam a eficácia do fluoreto de estanho e fluoreto de sódio, quando sujeitos a diferentes desafios erosivos. Neste estudo, concluíram que o fluoreto de estanho continua a oferecer proteção depois de vários desafios, enquanto que o fluoreto de sódio perde o seu efeito. Também Yönel et al. (2016) confrontou os benefícios dos dois fluoretos, admitindo o efeito significativamente positivo do estanho na proteção a substâncias erosivas. Seria, assim, interessante comparar estes dois compostos quando aplicados nos vários “timings” e observar a sua eficácia na remineralização do esmalte.

Por fim, o colutório Meridol[®] revelou um aumento significativo na remineralização do esmalte dentário, como constatou Madléna (2013), apesar de aplicado em diferentes momentos. Os fluoretos de estanho e de amina aplicados, mostraram conseguir minimizar os efeitos da erosão, sempre que aplicados previamente à bebida carbonatada, demonstrando os resultados justamente esse efeito protetor que conferem à superfície do esmalte.

“Timing” na aplicação de um colutório à base de flúor no esmalte erodido

CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados, é possível concluir-se que existem alterações a nível quantitativo e qualitativo na superfície do esmalte dentário, quando aplicado um colutório de fluoreto de estanho e fluoreto de amina, após erosão com uma bebida carbonatada.

A aplicação do colutório Meridol[®] teve como momento mais favorável à remineralização do esmalte dentário, o “*timing* antes e depois”. O “*timing* antes”, também revelou valores elevados de remineralização quando aplicado o colutório, após o ciclo erosivo com a bebida carbonatada RedBull[®].

As imagens obtidas através da microscopia eletrónica de varrimento (MEV) são compatíveis com os resultados da microdureza de superfície.

Existem, assim, diferenças significativas na microdureza de superfície do esmalte dentário dos diferentes timings de aplicação do colutório de fluoreto de estanho e fluoreto de amina, no esmalte erodido.

“Timing” na aplicação de um colutório à base de flúor no esmalte erodido

BIBLIOGRAFIA

- Algarni, A. A., Mussi, M. C. M., Moffa, E. B., Lippert, F., Zero, D. T., Siqueira, W. L., & Hara, A. T. (2015). The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128196>
- Alhilou, A., Do, T., Mizban, L., Clarkson, B. H., Wood, D. J., & Katsikogianni, M. G. (2016). Physicochemical and Antibacterial Characterization of a Novel Fluorapatite Coating. *ACS Omega*, *1*(2), 264–276. <http://doi.org/10.1021/acsomega.6b00080>
- Amaechi, B. T., Higham, S. M., Edgar, W. M., & Milosevic, a. (1999). Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *Journal of Dental Research*, *78*(12), 1821–1828. <http://doi.org/10.1177/00220345990780120901>
- Austin, R. S., Giusca, C. L., Macaulay, G., Moazzez, R., & Bartlett, D. W. (2016). Confocal laser scanning microscopy and area-scale analysis used to quantify enamel surface textural changes from citric acid demineralization and salivary remineralization in vitro. *Dental Materials*, *32*(2), 278–284. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.016>
- Byeon, S. M., Lee, M. H., & Bae, T. S. (2016). The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restorative Dentistry & Endodontics*, *41*(2), 121–129. <http://doi.org/10.5395/rde.2016.41.2.121>
- Caneppele, T. M. F., Jeronymo, R. D. I., Di Nicoló, R., de Araújo, M. A. M., & Soares, L. E. S. (2012). In vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: Surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Brazilian Dental Journal*, *23*(4), 373–378. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402012000400011>
- Carvalho, T. S., & Lussi, A. (2014). Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *Journal of Dentistry*, *42*(4), 450–459. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.01.004>
- Chen, C. L., Parolia, A., Pau, A., & Celerino De Moraes Porto, I. C. (2015). Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine

- tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Australian Dental Journal*, 60(1), 65–72. <http://doi.org/10.1111/adj.12275>
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1187–97. <http://doi.org/10.1177/0022034510376046>
- Dadamio, J., Van Tournout, M., Teughels, W., Dekeyser, C., Coucke, W., & Quirynen, M. (2013). Efficacy of different mouthrinse formulations in reducing oral malodour: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(5), 505–513. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12090>
- Erdemir, U., Yildiz, E., Eren, M. M., & Ozel, S. (2012). Surface hardness of different restorative materials after long-term immersion in sports and energy drinks. *Dental Materials Journal*, 31(5), 729–736. <http://doi.org/10.4012/dmj.2012-054>
- Hannig, M., Fiebiger, M., Guntzer, M., Döbert, A., Zimehl, R., & Nekrashevych, Y. (2004). Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Archives of Oral Biology*, 49(11), 903–910. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.05.008>
- Hannig, M., Hess, N. J., Hoth-Hannig, W., & De Vrese, M. (2003). Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clinical Oral Investigations*, 7(3), 158–161. <http://doi.org/10.1007/s00784-003-0219-2>
- Ionta, F. Q., Mendonça, F. L., De Oliveira, G. C., De Alencar, C. R. B., Honório, H. M., Magalhães, A. C., & Rios, D. (2014). In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *Journal of Dentistry*, 42(2), 175–179. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.009>
- Kulik, E. M., Walimo, T., Weiger, R., Schweizer, I., Lenkeit, K., Filipuzzi-Jenny, E., & Walter, C. (2015). Development of resistance of mutans streptococci and Porphyromonas gingivalis to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 19(6), 1547–1553. <http://doi.org/10.1007/s00784-014-1379-y>
- Lee, B.-S., Chou, P.-H., Chen, S.-Y., Liao, H.-Y., & Chang, C.-C. (2015). Prevention of enamel demineralization with a novel fluoride strip: enamel surface composition and depth profile. *Sci Rep*, 5(1), 13352. <http://doi.org/10.1038/srep13352>
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, S12–S20. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)

- Loke, C., Lee, J., Sander, S., Mei, L., & Farella, M. (2016). Factors affecting intra-oral pH - a review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 43(10), 778–785.
<http://doi.org/10.1111/joor.12429>
- Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2015). The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Research*, 49(suppl 1), 18–29.
<http://doi.org/10.1159/000380886>
- Madléna, M. (2013). Experiences with amine fluoride containing products in the management of dental hard tissue lesions focusing on Hungarian studies: A review. *Acta Medica Academica*, 42(2), 189–197. <http://doi.org/10.5644/ama2006-124.86>
- O'Toole, S., Bartlett, D. W., & Moazzez, R. (2016). Efficacy of sodium and stannous fluoride mouthrinses when used before single and multiple erosive challenges. *Australian Dental Journal*, Epub Ahead of Print. <http://doi.org/10.1111/adj.12418>
- O'Toole, S., Mistry, M., Mutahar, M., Moazzez, R., & Bartlett, D. (2015). Sequence of stannous and sodium fluoride solutions to prevent enamel erosion. *Journal of Dentistry*, 43(12), 1498–1503. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.10.003>
- Pinto, S. C. S., Bandeca, M. C., Silva, C. N., Cavassim, R., Borges, A. H., & Sampaio, J. E. C. (2013). Erosive potential of energy drinks on the dentine surface. *BMC Research Notes*, 6, 67. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-6-67>
- Rošin-Grget, K., Peroš, K., Šutej, I., & Bašić, K. (2013). The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, 42(2), 179–188.
<http://doi.org/10.5644/ama2006-124.85>
- Scaramucci, T., Borges, A. B., Lippert, F., Zero, D. T., Aoki, I. V., & Hara, A. T. (2015). Anti-erosive properties of solutions containing fluoride and different film-forming agents. *Journal of Dentistry*, 43(4), 458–465.
<http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.01.007>
- Strnad, G., & Buka, I. (2014). Effect of Acid Erosion Followed by Remineralization Process on Microhardness of Dental Enamel. *Procedia Technology*, 12, 308–315.
<http://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.12.491>
- Trivedi, K., Bhaskar, V., Ganesh, M., Venkataraghavan, K., Choudhary, P., Shah, S., & Krishnan, R. (2015). Erosive potential of commonly used beverages, medicated syrup, and their effects on dental enamel with and without restoration: An in vitro study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(6), 474.
<http://doi.org/10.4103/0975-7406.163508>
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de

- Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>
- Wang, Y. L., Chang, C. C., Chi, C. W., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Chuang, Y. C., ... Lin, C. P. (2014). Erosive potential of soft drinks on human enamel: An invitro study. *Journal of the Formosan Medical Association*, 113(11), 850–856. <http://doi.org/10.1016/j.jfma.2014.06.002>
- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42, S2–S11. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4)
- Yönel, N., Bikker, F. J., Lagerweij, M. D., Kleverlaan, C. J., van Loveren, C., Özen, B., ... van Strijp, A. J. P. (2016). Anti-erosive effects of fluoride and phytosphingosine: an in vitro study. *European Journal of Oral Sciences*, 124(4), 396–402. <http://doi.org/10.1111/eos.12283>
- Zheng, J., Xiao, F., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2009). Erosion behavior of human tooth enamel in citric acid solution. *Tribology International*, 42(11–12), 1558–1564. <http://doi.org/10.1016/j.triboint.2008.12.008>
- Zini, A., Krivoroutski, Y., & Vered, Y. (2014). Primary prevention of dental erosion by calcium and fluoride: A systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*, 12(1), 17–24. <http://doi.org/10.1111/idh.12049>